

**Phytochemische und pharmakologische
Untersuchungen der ätherischen Öle
aus Wurzel und Kraut von Ononis spinosa L.**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

des

Fachbereichs Pharmazie und Lebensmittelchemie

der Philipps-Universität Marburg/Lahn

vorgelegt

von

Karin Hilp

aus Bad Kreuznach

Marburg/Lahn 1976

**Phytochemische und pharmakologische
Untersuchungen der ätherischen Öle
aus Wurzel und Kraut von Ononis spinosa L.**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

des

**Fachbereichs Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn**

vorgelegt

von

Karin Hilp

aus Bad Kreuznach

Marburg/Lahn 1976



Vom Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie der Philipps-Universität
Marburg/Lahn als

Dissertation angenommen am

22.2.1976

Tag der mündlichen Prüfung am

28.4.1976

Berichterstatter:

Prof.Dr. H. Kating

Mitberichterstatter:

Prof.Dr. W. Schmid

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmazeutische Biologie der Philipps-Universität Marburg/Lahn auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof.Dr. H.Kating, dem ich für seine stets wohlwollende Förderung und großzügige Bereitstellung von Sachmitteln herzlich danken möchte.

Die pharmakologischen Untersuchungen wurden am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Philipps-Universität Marburg/Lahn unter Leitung von Herrn Prof.Dr. W.Schmid durchgeführt. Für Unterstützung und wertvollen Rat schulde ich Herrn Prof. Schmid großen Dank.

Für die Hilfe bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit möchte ich meinen Dank aussprechen: Frl. C.Hesse (Aufnahme von Massenspektren) und Herrn Dr. G.Schaden (Interpretation von Massenspektren), Institut für Pharmazeutische Chemie und Lebensmittelchemie, Herrn H.Rau (praktische Durchführung der pharmakologischen Versuche), Institut für Pharmakologie und Toxikologie sowie Herrn P.Zöfel (statistische Auswertung der pharmakologischen Versuche), Rechenzentrum der Universität Marburg/Lahn.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. <u>Allgemeiner Teil</u>	
I. Einleitung und Problemstellung	1
II. Herkunft und Kultur des Untersuchungsmaterials	3
III. Quantitativer Gehalt an ätherischem Öl in Wurzel und Kraut der Droge	4
IV. Charakterisierung der ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut der Droge	5
1. Physikalische und chemische Kennzahlen der ätherischen Öle	5
2. UV-Spektroskopie	6
3. IR-Spektroskopie	8
4. ¹ H-NMR-Spektroskopie	10
5. Dünnschichtchromatographie	13
6. Gaschromatographie	16
V. Chemische Zusammensetzung der ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut der Droge	18
1. Quantitative Zusammensetzung der ätherischen Öle nach Verbindungsklassen	18
2. Vergleichende halbquantitative Bestimmungen der durch unterschiedliche Destillationszeiten gewonnenen ätherischen Öle aus den Wurzeln der Droge	21
3. Untersuchung der Fettsäurefraktionen der ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut der Droge	23
4. GC-massenspektroskopische Untersuchungen der ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut der Droge nach Abtrennen saurer und basischer Anteile sowie der Kohlenwasserstoff-Fraktion	25
5. GC-massenspektroskopische Untersuchungen der Kohlenwasserstoffe der ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut der Droge	52

VI. Pharmakologische Untersuchungen	60
1. Aufgabenstellung	60
2. Beschreibung der Versuchsanordnung	62
3. Auf diuretische Wirksamkeit untersuchte Stoffgruppen	64
a) Ätherische Öle aus Wurzel und Kraut der Droge	64
b) Fraktionen der ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut der Droge	80
c) Infuse und Dekokte aus Wurzel und Kraut der Droge	81
d) Wäßrige Rückstände der Wasserdampfdestillationen der Wurzel Droge	88
4. Angabe eines Standards	93
5. Bestimmung der Na^+ -, K^+ - und Cl^- -Ionenkonzentrationen	99
VII. Diskussion der Versuchsergebnisse	101
VIII. Zusammenfassung	107

B. Experimenteller Teil

I. Phytochemische Untersuchungen	110
1. Untersuchte Pflanzen und Ernte des Materials	110
2. Allgemeine Methoden zur Analyse der ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut der Droge	110
a) Quantitative Bestimmung	110
b) Bestimmung chemischer Kennzahlen	111
c) Bestimmung physikalischer Kennzahlen	112
d) Spektroskopische Methoden	112
e) Chromatographische Untersuchungen	113
3. Halbquantitative Bestimmungen der durch unterschiedliche Destillationszeiten gewonnenen ätherischen Öle aus den Wurzeln der Droge	114
4. Auftrennung der ätherischen Wurzel- und Krautöle nach Verbindungsklassen	114
a) Analyse der Fettsäurefraktion	114
b) Abtrennung der Phenolfraktion	119
c) Abtrennung der Kohlenwasserstoff-Fraktion	119
d) Abtrennung der Carbonylverbindungen und der primären Alkohole	120

	Seite
e) Bestimmung des Estergehaltes und Auftrennung in Säurekomponente und Phenolkomponente des Esters	122
f) Abtrennung der Phenoläther und Carbonyl- verbindungen	122
5. Gewinnung geeigneter Fraktionen der ätherischen Öle für GC-massenspektroskopischen Untersuchungen	123
6. Bedingungen der GC-massenspektroskopischen Unter- suchungen	124
7. Quantitative Bestimmung von Anethol und Gammexan	125
II. Pharmakologische Untersuchungen	127
1. Verwendetes Tiermaterial	127
2. Durchführung der Diureseversuche	127
3. Auf diuretische Wirksamkeit untersuchte Stoffgruppen	129
a) Ätherische Öle aus Wurzel und Kraut der Droge	129
b) Fraktionen der ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut der Droge	130
c) Infuse und Dekokte aus Wurzel und Kraut der Droge	131
d) Wäßrige Rückstände der Wasserdampfdestillationen der Wurzeldroge	133
4. Bestimmung der Na^+ -, K^+ - und Cl^- -Ionenkonzentra- tionen	133
5. Statistische Auswertung und graphische Darstellung der Versuche	134
C. <u>Literaturverzeichnis</u>	136

A. Allgemeiner Teil

I. Einleitung und Problemstellung

Gegenstand der Untersuchungen war die dornige Hauhechel, *Ononis spinosa* L., ein zu den Fabaceae gehörender Halbstrauch, der mit Ausnahme der nördlichsten Gebiete und des Hochgebirges in ganz Europa, in Westasien sowie in Nordafrika beheimatet ist (siehe Abb.1).



Abb.1: Verbreitungsgebiet von *Ononis spinosa* L. nach G.Madaus (1938).

Die Wurzeln der dornigen Hauhechel finden seit dem Altertum medizinische Verwendung und waren als Bestandteil der Species diureticae und der Species Lignorum des DAB 6 offizinell. Sie sind im DAB 7 DDR und im ÖAB 9 aufgeführt und werden bis heute in Form wäßriger Zubereitungen medizinisch genutzt.

Nicht in den Arzneibüchern aufgenommen, jedoch ebenfalls als diuretisch wirksam beschrieben (R.Jaretsky und A.Sievers, 1933), sind die oberirdischen Teile der Pflanze.

Die Wirksamkeit der *Ononis spinosa* L. als Diuretikum ist in der Literatur umstritten, wobei Art und Konzentration ihrer Zubereitung eine wesentliche Rolle spielen. So wird

die Wurzel Droge in Form eines Dekoktes als diuretisch wirksam (W. Buelow, 1891; I. Bulkowstein, ein Teil Droge auf vierzig Teile Wasser, 1916; H. Vollmer und K. Hübner, 1937; H. Vollmer und H. Hindemith, 1937), diuretisch unwirksam (I. Bulkowstein, ein Teil Droge auf fünf Teile Wasser, 1916; R. Jaretsky und A. Sievers, 1933) und diuresehemmend (R. Jaretsky und F. Neuwald, 1938) beschrieben.

Dem Infus der Wurzel Droge wird ebenfalls eine diuresesteigernde (E. Herre, 1937; R. Jaretsky und F. Neuwald, 1938), eine diuretisch indifferente (K. Lotz, 1923; Th. Hehenkamp, ein Teil Droge auf zehn Teile Wasser, 1923) und eine diuresehemmende (Th. Hehenkamp, ein Teil Droge auf fünf Teile Wasser, 1923) Wirkung zugesprochen. In bezug auf die diuretisch wirksame Komponente der Droge bestehen wiederum gegensätzliche Ansichten. Während H. Vollmer und A. Giebel (1938; siehe hierzu auch H. Vollmer, 1940) diese vorwiegend nicht wasserdampf flüchtigen Inhaltsstoffen zuschreiben, postulieren R. Jaretsky und F. Neuwald (1938 u. 1939) zwei gegensätzlich wirkende Bestandteile der Droge, eine mit Wasserdampf flüchtige Substanz, die die Diurese fördert, und eine nichtflüchtige, in Wasser schwerlösliche Substanz, die die Diurese hemmt (siehe S. 61).

In der Literatur werden als Inhaltsstoffe der Wurzel Droge neben geringen Mengen eines ätherischen Öles u. a. die Glykoside Ononin, Onon, Pseudoononin, der Triterpenalkohol Onocol (Onocerin), Ononid (F. Berger, 1960) sowie Trifolirhizin (Y. Fujise, T. Toda und S. Ito, 1965) genannt. Die Zusammensetzung des ätherischen Wurzelöles ist weitgehend unbekannt; lediglich Spinosin, eine als Phytosterin angesprochene Substanz, wird erwähnt (F. Neuwald, 1939).

Angaben über Inhaltsstoffe der Kraut Droge liegen bis jetzt nicht vor.

Ziel der Arbeit war es, die ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut von *Ononis spinosa* L. chemisch eingehender zu untersuchen und durch pharmakologische Prüfungen die umstrittene Frage zu klären, ob das ätherische Öl für die diuretische Wirksamkeit der Droge verantwortlich ist.

II. Herkunft und Kultur des Untersuchungsmaterials

Mehrere Herkünfte der *Ononis spinosa* L. wurden auf Versuchsfeldern des Instituts für Pharmazeutische Biologie in Marburg/Lahn in Kultur gehalten. Zudem fanden Pflanzen verschiedener, in der näheren Umgebung von Marburg/Lahn befindlicher Wuchsorte Verwendung.

Für unsere Untersuchungen benötigten wir große Drogenmengen. Da das Ausgraben der Hauhechelwurzeln an den Wuchsorten sehr zeitraubend war und nicht ausreichendes Untersuchungsmaterial lieferte, bezogen wir durch den Handel zusätzlich geschnittene Wurzeldroge, die ausschließlich von den Balkanländern stammte.

Die krautigen Teile der Droge wurden von den in Marburg/Lahn kultivierten *Ononis spinosa*-Halbsträuchern gewonnen. Die Ernte erfolgte zu Beginn der Blütezeit im Juni - Juli jeweils in den Vormittagsstunden.

Unmittelbar nach Abernten der oberirdischen Teile wurden einige Wurzeln ausgegraben und getrocknet. Diese Wurzeldroge wurde zu vergleichenden chromatographischen Untersuchungen mit der vom Balkan stammenden Handelsdroge herangezogen.

III. Quantitativer Gehalt an ätherischem Öl in Wurzel und Kraut der Droge

Zur Gewinnung der ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut der Droge wurde die "Karlsruher Apparatur" nach E. Stahl (Fa. Bender und Hobein GmbH , München, zur Technik der Wasserdampfdestillation siehe S. 110) verwendet.

Die Ausbeute an ätherischem Öl betrug für die Wurzeldroge nach halbstündiger Destillationszeit 0,009 % und stieg kontinuierlich bis zur sechsstündigen Destillationsdauer auf 0,021 % an. Die Krautdroge lieferte nach einer Wasserdampfdestillation von sechs Stunden 0,028 % ätherisches Öl. Längere Destillationszeiten brachten keine größere Ausbeute an wasserdampflichten Substanzen.

Die Extraktion der Droge mit Methylenchlorid im Soxhlet und anschließender Wasserdampfdestillation des gewonnenen Extraktes ergab eine kleinere Ausbeute an ätherischem Öl und soll deshalb nicht weiter beschrieben werden.

Durch diese Ergebnisse kann der von H. Hänsel (1910) für die Wurzeldroge angegebene Gehalt von 0,02 % eines ätherischen Öles bestätigt werden. Dagegen erscheint nach unseren Untersuchungen der von F. Neuwald (1939) ermittelte Wert von 0,2 % selbst dann wesentlich zu hoch, wenn mögliche quantitative Änderungen durch klimatische Einflüsse, Bodenbeschaffenheit und Entwicklungszustand der Pflanze berücksichtigt werden.

Über den Gehalt an ätherischem Öl in den oberirdischen Teilen der Droge lagen bislang keine Angaben vor.

Alle weiteren Untersuchungen wurden, wenn nichts anderes angegeben ist, mit dem durch sechsstündige Wasserdampfdestillation gewonnenen ätherischen Öl der vom Balkan stammenden Wurzeldroge sowie der in Marburg/Lahn kultivierten Krautdroge durchgeführt.

IV. Charakterisierung der ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut der Droge

1. Physikalische und chemische Kennzahlen der ätherischen Öle

Physikalische Daten (Dichte, Refraktion, spezifische Drehung, Siedeverhalten usw.) und chemische Kennzahlen (Säurezahl, Esterzahl, Jodzahl usw.) waren bis zur Einführung der modernen chromatographischen und spektroskopischen Methoden die wesentlichen Kriterien ätherischer Öle. So wird zur Prüfung auf Reinheit die Dichte und insbesondere die spezifische Drehung ätherischer Öle bestimmt und als Maß für die Qualität häufig chemische Kennzahlen ermittelt (z.B.: die Hydroxylzahl des Pfefferminzöles des DAB 7).

Über die physikalischen und chemischen Kennzahlen der ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut von *Ononis spinosa* L. lagen in der Literatur bislang keine Angaben vor. Die Ergebnisse der Analysen zur Charakterisierung mittels physikalischer und chemischer Kennzahlen sind in Tab.1 zusammengestellt worden.

Tabelle 1: Physikalische und chemische Kennzahlen der ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut von *Ononis spinosa* L.

	Wurzel	Kraut
spezifische Drehung	+ 6,2°	+ 3,4°
Brechungsindex n_D^{50}	1,4750	1,4521
Schmelzpunkt	35 - 38°C	45 - 48°C
Säurezahl	100	158
Jodzahl	90	61
Verseifungszahl	114	163
Dichte (bei 60°C)	0,893	0,849

Die ätherischen Öle der dornigen Hauhechel lassen sich nach den durchgeführten Analysen folgendermaßen charakterisieren:

Das ätherische Öl der Wurzeldroge ist bei Zimmertemperatur von butterartiger Konsistenz mit einem Schmelzintervall von $35 - 38^{\circ}\text{C}$. Es ist rechtsdrehend (+ 6,2) und besitzt eine hohe Säurezahl von 100 und eine Verseifungszahl von 114.

Das ätherische Öl der Krautdroge ist bei Zimmertemperatur fest und zeigt einen Schmelzintervall von $45 - 48^{\circ}\text{C}$. Es ist ebenfalls rechtsdrehend (+ 3,4); seine Werte von 158 für Säurezahl und 163 für Verseifungszahl liegen bedeutend über denen des Wurzelöles.

Aufgrund der hohen Säurezahlen dürften freie Fettsäuren den wesentlichen Bestandteil der ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut von *Ononis spinosa* L. bilden (siehe S. 5), wobei der größere Anteil in der Krautdroge zu erwarten ist. Der hohe Gehalt an freien Fettsäuren kann zudem als Erklärung für die butterartige bzw. feste Konsistenz der ätherischen Öle gelten.

Die niedrigen Esterzahlen von 14 bei dem ätherischen Wurzelöl und 5 bei dem ätherischen Krautöl lassen nur geringe Mengen an Estern erwarten.

2. UV-Spektroskopie

Da in der Literatur bislang keine Angaben über UV-Spektren der ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut von *Ononis spinosa* L. vorliegen, wurden diese aufgenommen und miteinander verglichen (siehe Abb.2). Beim ätherischen Öl der vom Balkan stammenden Wurzeldroge sind ausgeprägte Maxima bei 229 und 258 nm sowie Schultern bei 251 und 270 nm zu beobachten. Wie das als Vergleich aufgenommene UV-Spektrum (Lösungsmittel: Methanol p. a.) von trans-Anethol mit einem Maximum bei 259 nm (siehe H.A.Laitinen und Mitarb., 1947, λ_{max} bei 262 nm, Lösungsmittel: Chloroform) sowie einer Schulter bei 270 nm zeigt, trägt dieser Inhaltsstoff des ätherischen Wurzelöles wesentlich zur Absorption im Bereich von 230 bis 280 nm bei (siehe Abb.3). Das ätherische Öl der Krautdroge besitzt kein Maximum und zwei Schultern bei 231 und 280 nm.

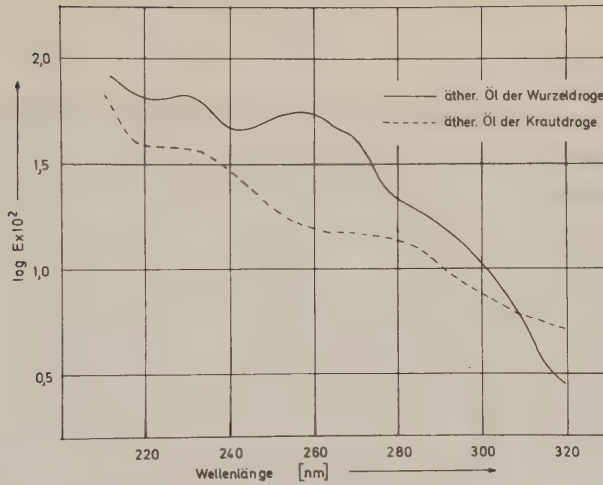


Abb. 2: UV-Spektren der ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut von *Ononis spinosa* L. (Lösungsmittel: Methanol p. a.).

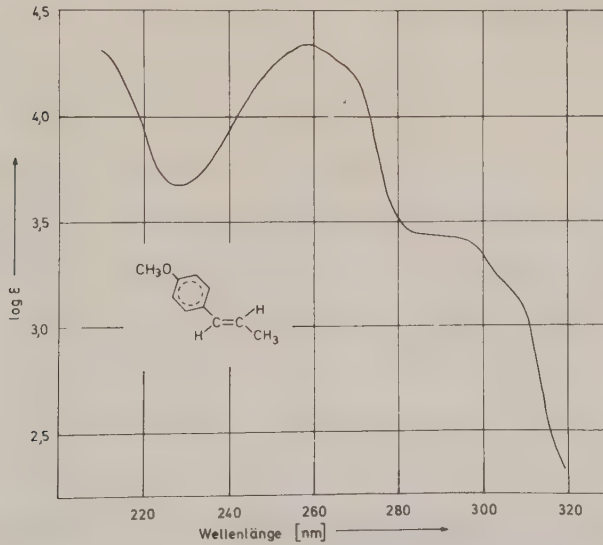


Abb. 3: UV-Spektrum von trans-Anethol (Lösungsmittel: Methanol p. a.).

3. IR-Spektroskopie

Zur Analyse ätherischer Öle wird bisweilen die IR-Spektroskopie herangezogen (siehe B.Casu und M.Reggiani, 1956), die Hinweise auf funktionelle Gruppen von Komponenten und eine gute Charakterisierung liefert. Aus diesem Grunde nahmen wir die IR-Spektren der ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut von *Ononis spinosa* L. auf und verglichen sie miteinander.

Der hohe Anteil an freien Fettsäuren prägt sowohl das IR-Spektrum des ätherischen Öles aus den Wurzeln als auch aus dem Kraut der Droge. Als Vergleich wurde das IR-Spektrum der Palmitinsäure gewählt. Die Abbildungen 4, 5 und 6 geben die IR-Spektren der ätherischen Öle aus den Wurzeln und dem Kraut der dornigen Hauhechel sowie das IR-Spektrum der Palmitinsäure wieder. Daraus wird deutlich, daß sämtliche starken bis mittleren Schwingungen in allen drei Spektren identisch sind. Ein Vergleich der Spektren der ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut zeigt eindeutig, daß Fettsäuren im Krautöl überwiegen, während in der Wurzel noch eine größere Zahl anderer Komponenten vorliegt.

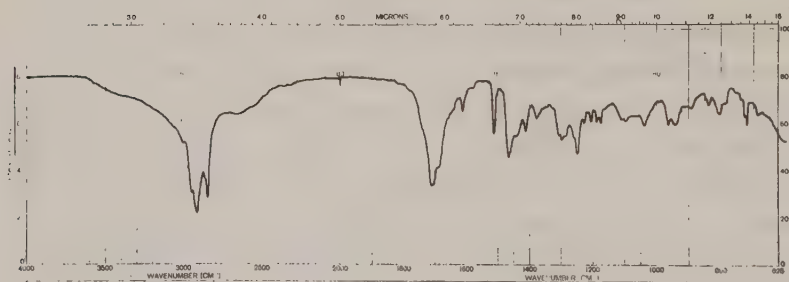


Abb.4: IR-Spektrum des ätherischen Öles aus den Wurzeln von *Ononis spinosa* L. als Film zwischen NaCl-Fenstern.

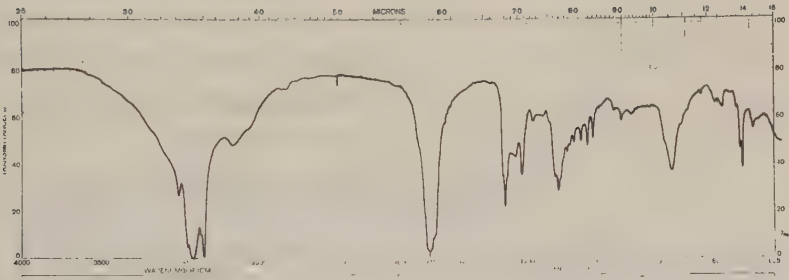


Abb. 5: IR-Spektrum des ätherischen Öles aus dem Kraut von *Ononis spinosa* L. als Film zwischen NaCl-Fenstern.

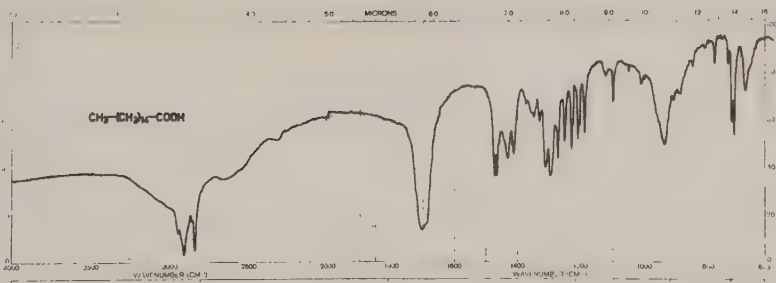


Abb. 6: IR-Spektrum der Palmitinsäure als KBr-Preßling.

4. ^1H -NMR - Spektroskopie

Zur allgemeinen Charakterisierung der beiden ätherischen Öle wurden auch ihre ^1H -NMR-Spektren aufgenommen und mit den ^1H -NMR-Spektren der Palmitin- und Ölsäure sowie von trans-Anethol verglichen, um Anhaltspunkte auf wesentliche Komponenten zu erhalten (Abb. 7 bis 11). Die Signale der Spektren beider ätherischen Öle weisen eindeutig auf einen hohen Gehalt an gesättigten Fettsäuren hin. Ungesättigte Fettsäuren werden durch das Auftreten eines Triplets bei δ 5,36 ppm (τ 4,64 ppm), das durch Überlagerung zweier Dublette der olefinischen Protonen ungesättigter Fettsäuren entsteht (siehe Abb.10), angezeigt. Aufgrund des größeren Anteils an ungesättigten Fettsäuren ist dieses Triplet im ätherischen Krautöl wesentlich stärker ausgeprägt als im ätherischen Wurzelöl. Eindeutige Hinweise auf das Vorkommen von trans-Anethol im ätherischen Wurzelöl werden durch die Signale bei δ 7,23 ppm (τ 2,77 ppm) und δ 6,80 ppm (τ 3,20 ppm) für die Phenylprotonen, bei δ 6,28 ppm (τ 3,72 ppm) und δ 6,08 ppm (τ 3,92 ppm) für die olefinischen Protonen sowie bei δ 3,75 ppm (τ 6,25 ppm) für die Protonen der Methoxygruppe gegeben. Das die Methylgruppe an der olefinischen Doppelbindung anzeigende Dublett bei δ 1,83 ppm (τ 8,17 ppm) (siehe Abb.11) fällt mit den Signalen der Protonen der Fettsäuren zusammen. Der Gipfel bei δ 4,78 ppm (τ 5,22 ppm) stimmt in seiner Lage mit dem Signal für die olefinischen Protonen der Isopropenylgruppe des Carvons überein (siehe hierzu N.S.Bhacca, L.F.Johnson und I.N.Shoolery, 1962).

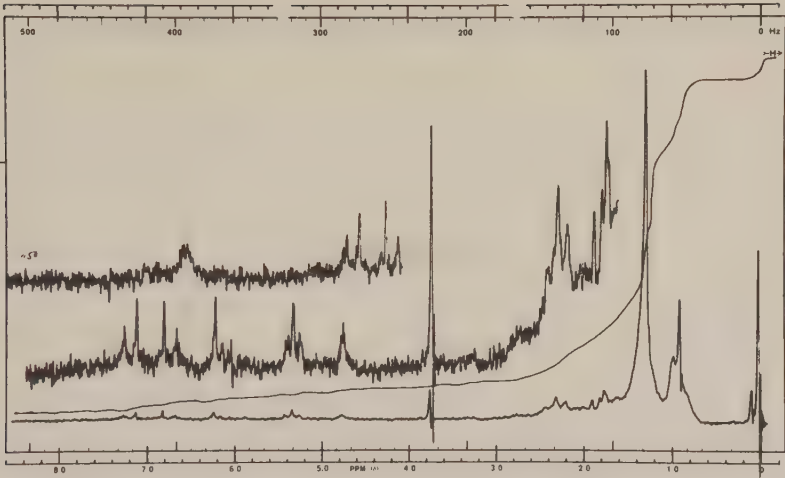


Abb. 7: ^1H -NMR-Spektrum des ätherischen Öles aus den Wurzeln von *Ononis spinosa* L. (in CCl_4 , TMS als innerer Standard).

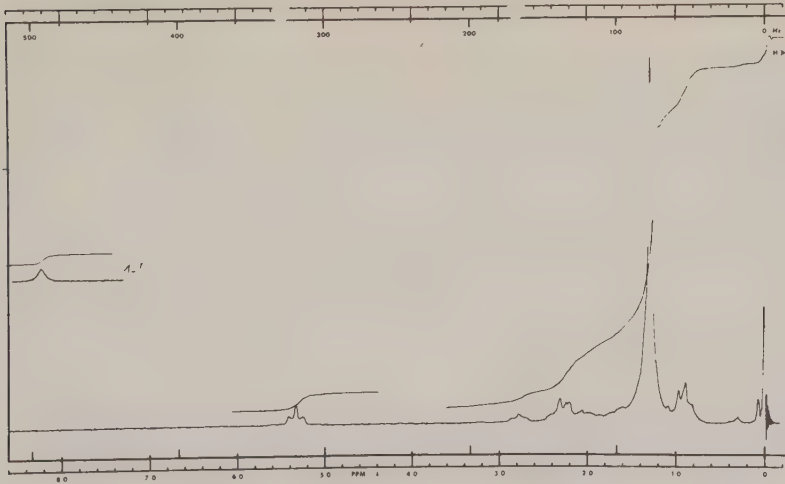


Abb. 8: ^1H -NMR-Spektrum des ätherischen Öles aus dem Kraut von *Ononis spinosa* L. (in CCl_4 , TMS als innerer Standard).

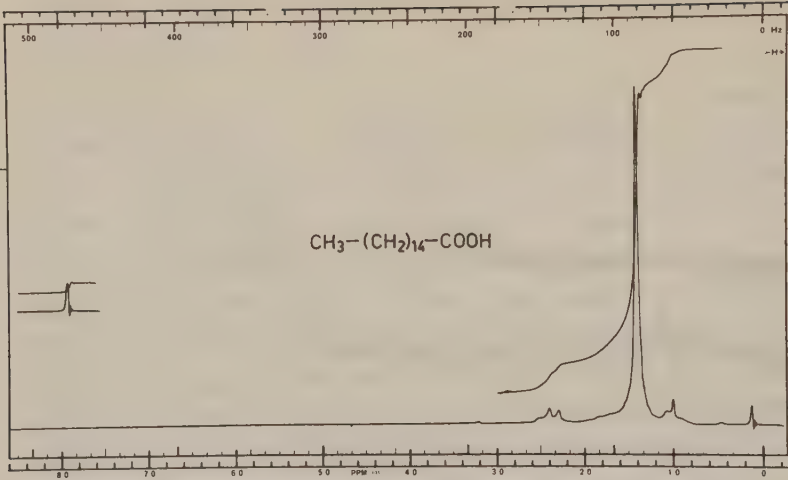


Abb. 9: ^1H -NMR-Spektrum der Palmitinsäure (in CCl_4 , TMS als innerer Standard).

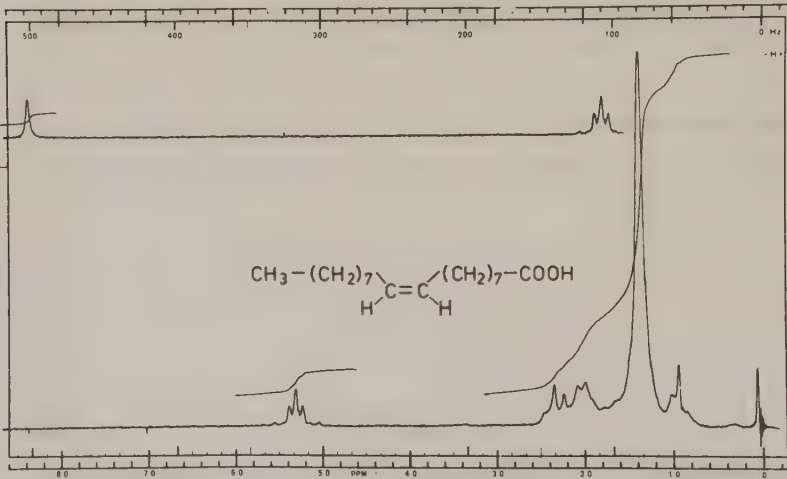


Abb. 10: ^1H -NMR-Spektrum der Ölsäure (in CCl_4 , TMS als innerer Standard).

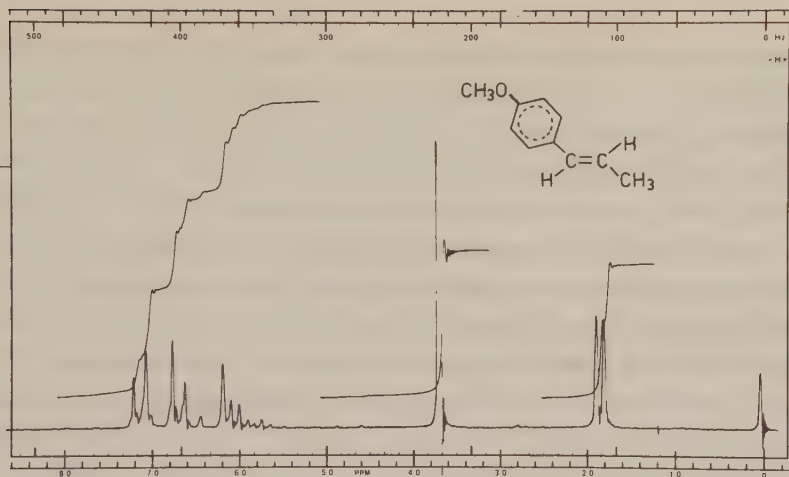


Abb. 11: ^1H -NMR-Spektrum von trans-Anethol (in CCl_4 , TMS als innerer Standard).

5. Dünnschichtchromatographie

Dünnschichtchromatographisch untersucht wurden die durch sechsstündige Wasserdampfdestillation gewonnenen ätherischen Öle der vom Balkan stammenden Wurzel- droge sowie der von den Versuchsfeldern des Instituts für Pharmazeutische Biologie in Marburg/Lahn stammenden Krautdroge. Zu vergleichenden Untersuchungen wurde zudem das nach sechsstündiger Wasserdampfdestillation abgeschiedene ätherische Öl aus den Wurzeln der auf den Versuchsfeldern in Marburg/Lahn kultivierten Pflanzen herangezogen.

Von den Fließmitteln a) Benzol p.a., b) n-Hexan/Eisessig/Äthylacetat (85:10:5) und c) Petroläther ($40-60^\circ\text{C}$) /Äther (90:10) erwies sich Benzol p.a. als am besten geeignet.

Aus den Dünnschichtchromatogrammen (siehe Abb. 12) wird wiederum sichtbar, daß sich die ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut im Spektrum der Flecken grundlegend unterscheiden. So sind in den Wurzeln nicht nur mehr, sondern in bezug auf Größe und Farbe anders gestaltete Flecken als im Kraut zu beobachten.

Auf Grund ihrer Intensität besonders zu erwähnen sind aus den Wurzeln die Flecken 1 (a) [$R_f = 0,03$], 3 (a) [$R_f = 0,11$], 7 (a) [$R_f = 0,25$], 11 (a) [$R_f = 0,49$], 15 (a) [$R_f = 0,79$] sowie 16 (a) [$R_f = 0,87$] und 17 (a) [$R_f = 0,89$], aus dem Kraut die Flecken 1 (b) [$R_f = 0,04$], 2 (b) [$R_f = 0,12$], 6 (b) [$R_f = 0,38$] und 10 (b) [$R_f = 0,87$]. Um hierzu genauere Aussagen machen zu können, fertigten wir von allen mit Hilfe der GC-Massenspektrometrie identifizierten Inhaltsstoffen (siehe S. 25) unter den oben beschriebenen Bedingungen Dünnschichtchromatogramme an. Abb.12 zeigt repräsentative Dünnschichtchromatogramme der ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut der Droge sowie der von uns durch GC-Massenspektrometrie identifizierten Substanzen. Hieraus geht hervor, daß in den ätherischen Wurzelölen nach steigenden R_f -Werten Borneol (Fleck 5 (a), $R_f = 0,19$), Linalool (Fleck 6 (a), $R_f = 0,21$), Menthol und Carvon (Fleck 7 (a), $R_f = 0,24$), Campher (Fleck 10 (a), $R_f = 0,46$), Menthon (Fleck 11 (a), $R_f = 0,49$) sowie Estragol und Anethol (Fleck 15 (a), $R_f = 0,79$) enthalten sind. Durch weitere Vergleiche wurde festgestellt, daß die Flecken 1 (a) [$R_f = 0,03$] Fettsäuren sowie 16 (a) [$R_f = 0,87$] und 17 (a) [$R_f = 0,89$] Kohlenwasserstoffe sind.

Die vom Balkan stammende Wurzeldroge ist durch Größe und Farbintensität der Flecken 7 (a) und 15 (a) charakterisiert. Die gleichen Flecken zeigen im ätherischen Öl der in Marburg/Lahn kultivierten Pflanzen nur schwache Intensität. Auch die Flecken 5 (a), 6 (a) und 11 (a) sind im ätherischen Wurzelöl der Balkandroge ausgeprägter gestaltet. Als Erklärung hierfür dürften unterschiedliche klimatische Einflüsse in Frage kommen; evtl. ist auch ein anderer Zeitpunkt der Ernte für diese quantitativen Abweichungen verantwortlich zu machen. (Leider waren trotz mehrmaligem Anfragen bei der Lieferfirma keine genauen Angaben über Art, Herkunft sowie Trocknung und Lagerung der Balkanware zu erhalten.)

Im Chromatogramm des ätherischen Öles des Krautes konnten die Flecken 1 (b) [$R_f = 0,04$] als Fettsäuren, 9 (b) [$R_f = 0,65$] als Palmitinsäuremethylester sowie Palmitinsäureäthylester und 10 (b) [$R_f = 0,87$] sowie 11 (b) [$R_f = 0,89$] als Kohlenwasserstoffe identifiziert werden. Fleck 1 (b) zeigt im Chromatogramm der Krautdroge stärkere Intensität als Fleck 1 (a) im Chromatogramm der Wurzeldroge, wodurch die quantitativen Angaben (siehe S. 20) bestätigt werden.

Gleiche R_f -Werte sowie gleiche Färbungen mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz weisen in den Chromatogrammen der ätherischen Wurzel (a)- und Krautöle (b) die Flecken 3 (a) und 2 (b), 16 (a) und 10 (b) sowie 17 (a) und 11 (b) auf, wobei Fleck 11 (b) allerdings nur sehr schwach angezeigt wird. Während die Flecken 16 (a) und 10 (b) sowie 17 (a) und 11 (b) als Kohlenwasserstoffe erkannt wurden, konnten die Flecken 3 (a) und 2 (b) bis jetzt nicht identifiziert werden. Ob weitere gleiche Inhaltsstoffe in Wurzel und Kraut der Droge vorhanden sind, kann nicht mit Bestimmtheit gesagt werden, da bei der Vielzahl der Komponenten einzelne Flecken überlagert oder ihre R_f -Werte - je nach Konzentration des vorliegenden Inhaltsstoffes - verschoben werden können.

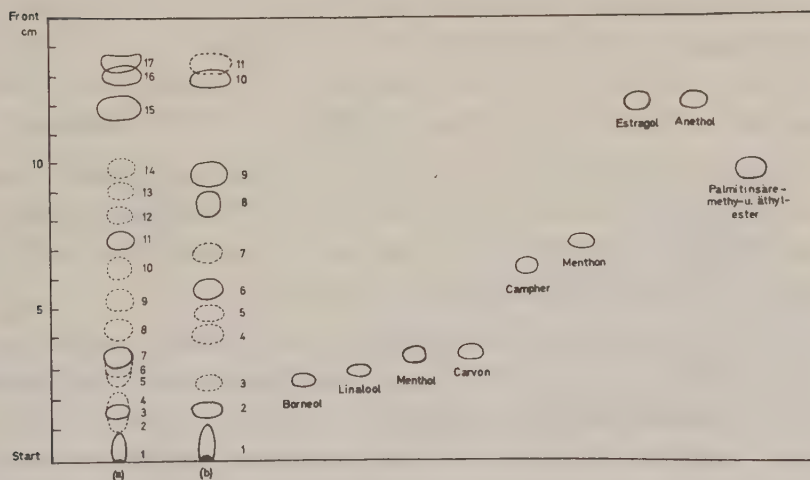


Abb. 12: Dünnschichtchromatogramme der ätherischen Öle aus Wurzel (a) und Kraut (b) von *Ononis spinosa* L. sowie der durch GC-Massenspektrometrie identifizierten Substanzen.

6. Gaschromatographie

Zur Untersuchung gelangten die ätherischen Öle der vom Balkan stammenden Wurzeldroge sowie der in Marburg/Lahn kultivierten Krautdroge. Um ein Verschmutzen der Säule zu vermeiden, wurde die Fraktion der Fettsäuren abgetrennt (siehe S. 114).

Abbildung 13 stellt die mittels einer Polypropylenglykolsäule unter gleichen Bedingungen (siehe Experimenteller Teil, S. 113) erhaltenen Fraktogramme dieser ätherischen Öle dar. Aus Anzahl und Retentionszeit der einzelnen Gipfel wird wiederum sichtbar, daß die ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut der Droge unterschiedlich zusammengesetzt sind. Mit Hilfe der von uns in der ersten Siedefraktion identifizierten Substanzen (siehe S. 28) konnte das Gaschromatogramm des ätherischen Öles der Wurzel näher charakterisiert werden. Mit steigender Retentionszeit sind hier zu nennen: Linalool (7,3 min), Menthon (7,9 min), Campher (8,2 min), Menthol (10,2 min), Estragol (10,4 min), Borneol (11,2 min), Carvon (12,6 min) und Anethol (15,9 min). Durch die Größe der Spitzen wird der relativ hohe Gehalt an Anethol, Carvon und Menthol im ätherischen Wurzelöl angezeigt.

Für Anethol, das nach Abtrennen der Fettsäurefraktion die Hauptkomponente des ätherischen Öles der Balkandroge darstellt, konnte nach der Methode des inneren Standards (H.Farnow, ohne Jahr) unter Eichung mit probeneigener Substanz ein Gehalt von 0,7 % des ätherischen Gesamtöles errechnet werden.

Das Gaschromatogramm des ätherischen Öles aus dem Kraut zeigt - verglichen mit dem aus der Wurzel - einen größeren Anteil polarer Substanzen mit langen Retentionszeiten. Hauptgipfel sind bei den Retentionszeiten von 4,5 min, 5,7 min, 7,8 min, 8,6 min sowie 28,1 min anzutreffen. Durch Zuspitzen der im ätherischen Wurzelöl identifizierten Substanzen konnte nachgewiesen werden, daß diese nicht im ätherischen Krautöl enthalten sind. Andere Gipfel hingegen erscheinen in den Chromatogrammen der ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut der Droge bei gleichen Retentionszeiten. Ob diese auf gleiche Inhaltsstoffe der Wurzel- und Krautdroge zurückzuführen sind, müßte noch geklärt werden.

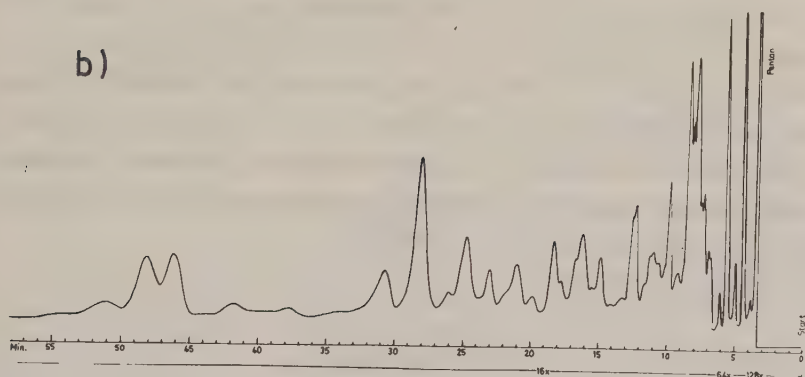
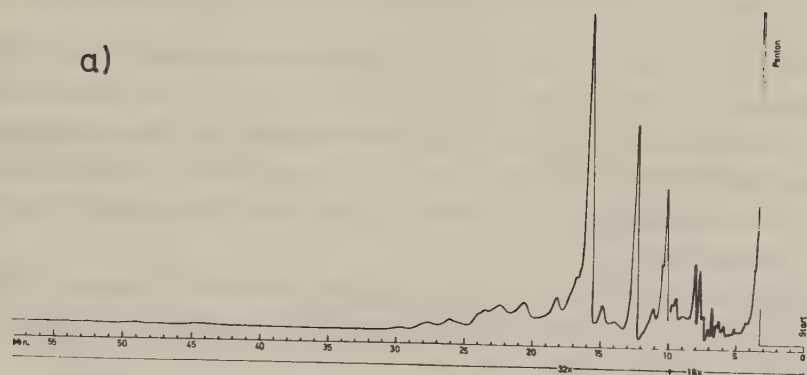


Abb. 13a + 13b: Gaschromatogramme der ätherischen Öle aus a) Wurzel und b) Kraut von *Ononis spinosa* L. (Bedingungen siehe Experimenteller Teil, S. 113).

V. Chemische Zusammensetzung der ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut der Droge

1. Quantitative Zusammensetzung der ätherischen Öle nach Verbindungsklassen

Nachdem die chromatographischen Untersuchungen der ätherischen Öle eine Vielzahl einzelner Komponenten gezeigt hatten, erschien es notwendig, eine Fraktionierung in Verbindungsklassen durch chromatographische und chemische Ausscheidungsanalysen durchzuführen. Dabei bezogen wir uns im wesentlichen auf die Angaben von E. Gildemeister und F. Hoffmann (1960), E. Bayer (1962), E. Stahl (1967) sowie W. Rinn (1970).

Besondere Bedeutung kam der Gewinnung einzelner Fraktionen im Hinblick auf die durchzuführenden pharmakologischen Prüfungen der ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut der Droge zu (siehe S. 64).

Zur Trennung in Verbindungsklassen wurden zunächst die durch sechsstündige Destillationsdauer gewonnenen ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut herangezogen (siehe hierzu auch H. Kating und Mitarb., 1971). Für weitere pharmakologische Untersuchungen wurde zudem das durch vierstündige Destillation gewonnene ätherische Öl der Wurzeldroge in seine ersten drei Hauptfraktionen aufgetrennt.

Die Fraktionierung in Verbindungsklassen wurde quantitativ durchgeführt (siehe Abb. 14). Der Analysengang war für Wurzel- und Krautdroge gleich, wobei die Trennung des durch vierstündige Destillation gewonnenen ätherischen Wurzelöles sowie des durch sechsstündige Destillation abgeschiedenen ätherischen Krautöles mit Fraktion IV beendet wurde.

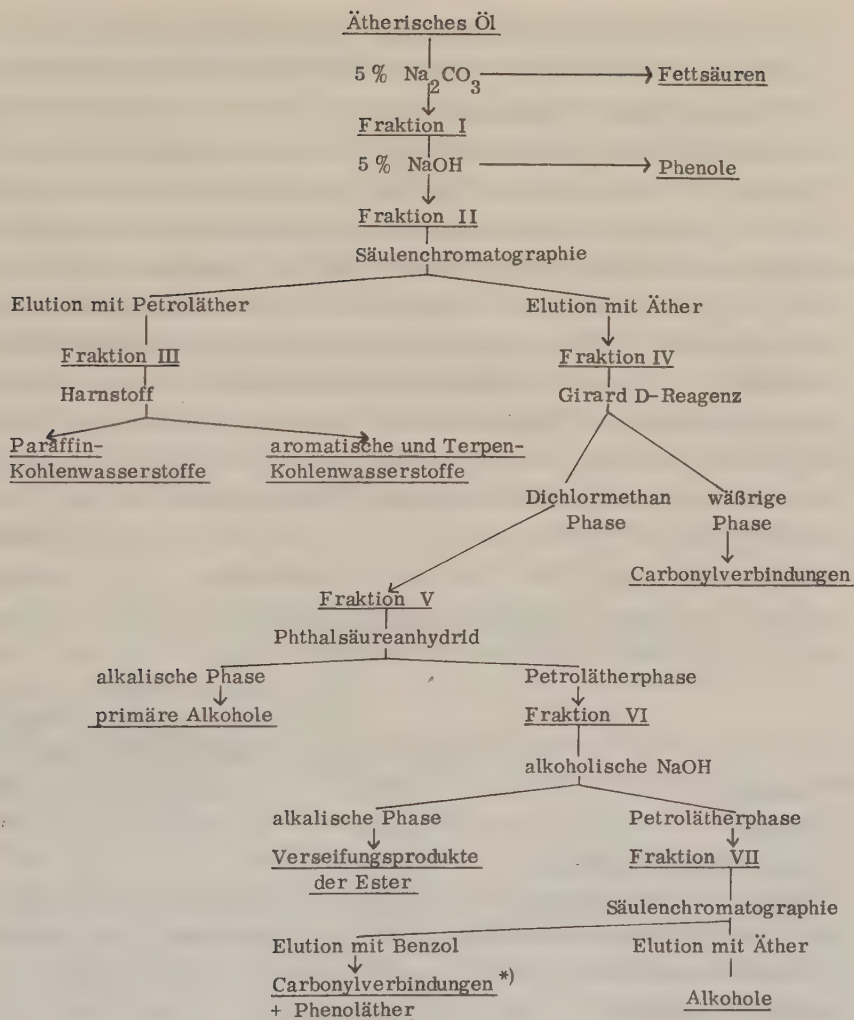


Abb. 14: Schematische Darstellung des Analysenganges zur Auftrennung der ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut von *Ononis spinosa* L. nach Verbindungsklassen (die Auftrennung des durch vierstündige Destillation gewonnenen ätherischen Wurzelöles sowie des nach sechsstündiger Destillation abgeschiedenen ätherischen Krautöles wurde mit Fraktion IV beendet.).

*) Carbonylverbindungen, die mit Girard D-Reagenz nicht abgetrennt werden können (siehe hierzu W. Rinn, 1970, S. 88, Anmerkung 9).

Tabelle 2 gibt die Ergebnisse der quantitativen Auftrennung der ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut der Droge nach Verbindungsklassen wieder, wodurch bestätigt wird, daß freie Fettsäuren den Hauptbestandteil abgeben. Entsprechend ihrer hohen Säurezahlen enthalten das durch sechsstündige Destillationsdauer gewonnene ätherische Wurzelöl 51 % und das ätherische Krautöl 75 % freie Fettsäuren. Die Kohlenwasserstoffe, die als unpolare Substanzen aufgrund der Chromatogramme (siehe S. 13 u. 16) im ätherischen Öl der Wurzeldroge als größere Menge zu vermuten sind, bilden hier mit 22 % den zweitstärksten Anteil, während das ätherische Öl der Krautdroge nur 6 % Kohlenwasserstoffe enthält. Auch die von uns identifizierten aromatischen Kohlenwasserstoffe (siehe S. 52) sind aufgrund des Trennungsganges bei der Fraktion der Terpen-Kohlenwasserstoffe zu erwarten. Es folgen Alkohole mit einem Gehalt von 9 bis 10 % im ätherischen Öl der Wurzeldroge.

Das durch vierstündige Destillation gewonnene ätherische Wurzelöl ist durch einen kleineren Anteil an Fettsäuren (ca. 47 %) sowie einen höheren Gehalt an Kohlenwasserstoffen (ca. 25 %) und Restöl (ca. 24 %) gekennzeichnet.

Tabelle 2: Quantitative Zusammensetzung der ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut von *Ononis spinosa* L. nach Verbindungsklassen.

	Wurzel		Kraut
	Dest. d. 6 h	Dest. d. 4 h	Dest. d. 6 h
Fettsäuren	51 %	46-47 %	74-75 %
Phenole	Spuren	Spuren	—
Paraffin-Kohlenwasserstoffe	2 %	} 24-25 %	} 6 %
Terpen-Kohlenwasserstoffe u. aromatische Kohlenwasserstoffe	20 %		
Carbonylverbindungen	1 %		
primäre Alkohole	6-7 %	} 23-24 %	} 19 %
Säurekomponente der Ester	3 %		
Phenolkomponente der Ester	2-3 %		
Carbonylverbindungen u. Phenoläther	3-4 %		
Alkohole	3 %		

2. Vergleichende halbquantitative Bestimmungen der durch unterschiedliche Destillationszeiten gewonnenen ätherischen Öle aus den Wurzeln der Droge

Die im zweiten Teil (siehe S. 60) zu beschreibenden pharmakologischen Untersuchungen zur Diuresewirksamkeit der Droge hatten gezeigt, daß die nach kürzeren Wasserdampf destillationen abgeschiedenen ätherischen Öle der Wurzeln verglichen mit den durch längere Destillationszeiten gewonnenen Ölen diuretisch stärker wirksam sind. Daraus ergab sich die Frage nach der Zusammensetzung unseres ätherischen Wurzelöles in Abhängigkeit zur Destillationsdauer.

Der in der Wurzeldroge befindliche geringe Anteil an ätherischem Öl (0,02 %) ließ uns von einer quantitativen Auftrennung durch chromatographische und chemische Ausscheidungsanalysen absehen. Stattdessen wurden mit Hilfe von Dünnschicht- und Gaschromatographie vergleichende halbquantitative Untersuchungen der durch halb-, ein-, zwei-, vier- und sechsstündige Destillationsdauer gewonnenen ätherischen Öle durchgeführt.

Alle Dünnschichtchromatogramme wurden von den jeweiligen ätherischen Gesamtölen angefertigt. Als Fließmittel diente wiederum Benzol p.a. (Merck). Nach dem Entwickeln der Platten wurde vor dem Ansprühen mit Vanillin-Schwefelsäure auch durch Einstellen in eine Jodkammer ausgewertet.

Abb.15 gibt die Dünnschichtchromatogramme der durch unterschiedliche Destillationszeiten gewonnenen ätherischen Öle wieder. Daraus ist zu ersehen, daß sich die einzelnen ätherischen Öle in ihrer quantitativen Zusammensetzung unterscheiden. Besonders bei den Flecken 1 ($R_f = 0,03$), 3 ($R_f = 0,11$), 7 ($R_f = 0,24$) und 15 ($R_f = 0,79$) ist eine quantitative Veränderung zu beobachten. Fleck 1, der durch Fettsäuren hervorgerufen wird, nimmt bei steigender Destillationsdauer von einer halben bis sechs Stunden kontinuierlich zu, bis schließlich im "Sechsstunden-Öl" eine annähernd doppelt so große Menge an Fettsäuren als im "Halbstunden-Öl" angezeigt wird. Dagegen werden die Flecken 3, 7 und 15 mit steigender Destillationsdauer kleiner und weniger farbtensiv, wobei besonders Fleck 15, der durch Estragol und Anethol hervorgerufen wird, beträchtlich (ca. um die Hälfte) abnimmt. Während Fleck 3 bis jetzt nicht identifiziert werden konnte, dürfte es sich bei Fleck 7 nach R_f -Wert und Färbung um Menthol und Carvon handeln (siehe S. 14). Bei diesen beiden Flecken werden die

quantitativen Unterschiede hauptsächlich durch Abnahme der Farbintensität ausgedrückt.

Zur Aufnahme der Gaschromatogramme (Bedingungen siehe Experimenteller Teil, S. 113) wurden die durch unterschiedliche Destillationszeiten gewonnenen ätherischen Öle von Fettsäuren befreit *). In allen Chromatogrammen wird als Hauptinhaltsstoff Anethol (Retentionszeit 15,9 min), gefolgt von Carvon (Retentionszeit 12,6 min) und Menthol (Retentionszeit 10,2 min) angezeigt; wesentliche quantitative Unterschiede sind nicht nachweisbar.

Somit kann an Hand der Dünnschicht- und Gaschromatogramme gesagt werden, daß mit steigender Destillationsdauer in unseren ätherischen Wurzelölen der Anteil an freien Fettsäuren zunimmt, während gleichzeitig verschiedene Hauptinhaltsstoffe in nahezu konstantem Verhältnis zueinander abnehmen, was als Verdünnung der leichtflüchtigeren Substanzen durch die schwerer flüchtigen Fettsäuren zu werten ist.

Ob eine der oben angesprochenen Verbindungen als Träger der diuretischen Wirksamkeit in Frage kommt, sollen die im zweiten Teil der Arbeit zu beschreibenden pharmakologischen Prüfungen abklären.

*) Die freien Fettsäuren werden auf der mit Polypropylenglykol als stationäre Phase belegten Makro-Golaysäule wegen der zu langen Retentionszeiten nicht getrennt, so daß - um ein Verschmutzen der Säule zu verhindern - diese vorher durch Ausschüteln mit Natriumcarbonatlösung abgetrennt werden müssen.

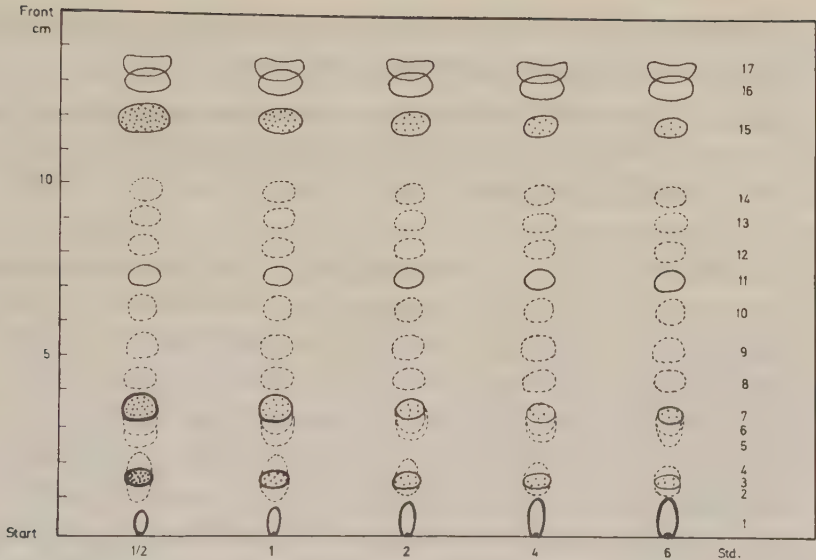


Abb.15: Dünnschichtchromatogramme der durch unterschiedliche Destillationszeiten gewonnenen ätherischen Öle aus den Wurzeln von *Ononis spinosa* L.

3. Untersuchung der Fettsäurefraktionen der ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut der Droge

Die oben beschriebenen quantitativen Bestimmungen hatten gezeigt, daß freie Fettsäuren den überwiegenden Anteil der ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut darstellen. Dabei sind die genauen Mengen dieser schwer flüchtigen Substanzen von der Dauer der Wasserdampfdestillation abhängig. Zur Untersuchung gelangten die Fettsäurefraktionen der durch sechsstündige Destillation gewonnenen ätherischen Öle aus Wurzeln der vom Balkan und Kraut der von den Versuchsfeldern in Marburg/Lahn stammenden Droge.

Abtrennung sowie Untersuchung freier Fettsäuren werden in der Literatur bereits ausführlich beschrieben (E.Gildemeister und F.Hoffmann, 1960 u. 1966; K.H.Bauer und H.Moll, 1954; E.Stahl, 1967; H.F.E.Nufer, 1965; K.D. Rehm, 1967; E.Jantzen und H.Andreas, 1960; H.K.Mangold und R.Kammereck, 1961; D.Heuser, 1968; A.Gläser u. Mitarb., 1962; H.Wagner und P.Pohl, 1964; H.Kating u. Mitarb., 1970).

Daher beschränkten wir uns in der vorliegenden Arbeit auf eine tabellarische Zusammenstellung der gewonnenen Ergebnisse (siehe Tab.3).

Tabelle 3: Prozentuale Zusammensetzung der Fettsäurefraktion (=100 %) der ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut von *Ononis spinosa* L.
($V_{rel.}$ bezogen auf Palmitinsäuremethylester , Bedingungen siehe Experimenteller Teil, S. 118).

Fettsäuren	$V_{rel.}$ d. ME	<i>Ononis spinosa</i> L. Wurzel (%)	<i>Ononis spinosa</i> L. Kraut (%)
Capronsäure	0,17	< 0,1	—
Önanthsäure	0,24	0,2	0,1
Caprylsäure	0,33	0,5	0,1
Pelargonsäure	0,41	0,1	0,3
Caprinsäure	0,52	1,8	0,4
Undecansäure	0,61	0,6	1,2
Laurinsäure	0,72	4,2	5,1
Tridecansäure	0,79	< 0,1	< 0,1
Myristinsäure	0,86	5,6	7,9
Pentadecansäure	0,93	3,5	1,6
Palmitinsäure	1,00	47,6	48,4
Palmitoleinsäure	1,04	5,3	0,6
Heptadecansäure	1,07	1,0	0,8
Stearinsäure	1,15	1,5	1,8
Ölsäure	1,18	3,7	2,8
Linolsäure	1,25	13,4	9,9
Linolensäure	1,36	11,0	19,0

Dünnschichtchromatographisch konnte die Anwesenheit von Epoxy- sowie Hydroxy-fettsäuren in beiden Fettsäuregemischen ausgeschlossen werden (vgl. hierzu K. Rehm, 1967). Aus Tab.3 geht hervor, daß 33 % der Fettsäuren des ätherischen Wurzelöles und 32 % des ätherischen Krautöles ungesättigt sind. Die Palmitinsäure stellt mit jeweils 48 % sowohl den Hauptbestandteil beider Fettsäurefraktionen als auch der ätherischen Gesamtöle (Wurzel 24 %, Kraut 36 %) dar. Als weitere Hauptinhaltsstoffe der Fettsäurefraktionen sind für die Wurzeldroge Linol- (13 %), Linolen- (11 %), Myristin- (6 %), Palmitolein- (5 %) und Laurinsäure (4 %), für die Krautdroge Linolen- (19 %), Linol- (10 %), Myristin- (8 %), Laurin- (5 %) und Ölsäure (3 %) zu nennen.

In diesem Zusammenhang seien unsere Versuche zur Isolierung und Strukturaufklärung des aus dem ätherischen Öl der Wurzeldroge von F. Neuwald (1939) in ca. 50 %iger Ausbeute gewonnenen und als Phytosterin angesprochenen Spinosins erwähnt. Durch mehrmaliges Umkristallisieren des ätherischen Öles aus Methanol - entsprechend den Angaben von F. Neuwald - wurden farblose Kristalle erhalten, die massenspektroskopisch als Palmitinsäure erkannt wurden. Die von F. Neuwald für Spinosin angegebenen Analysendaten (Schmelzpunkt 149°C , Elementaranalyse C 83,64 %, 83,66 %, H 11,80 %, 11,97 %, Molekulargewicht 346) sowie verschiedene positive Farbreaktionen unterscheiden sich jedoch so wesentlich von denen der Palmitinsäure (Schmelzpunkt $62,6^{\circ}\text{C}$, C 74,94 %, H 12,58 %, Molekulargewicht 256; vgl. Chemiker-Kalender, 1956), daß beide Substanzen nicht identisch sein können. Eine Erklärung für diese abweichenden Versuchsergebnisse dürfte in der unterschiedlichen Gewinnung der ätherischen Öle zu suchen sein. Bei Verwendung der Karlsruher Apparatur (siehe S. 110) werden die wasserdampfflüchtigen Substanzen in Pentan aufgefangen, wobei eine Verteilung dieser Stoffe zwischen lipophiler Phase und dem kondensierten, zurückfließenden Wasser erfolgt. Dagegen wurde das ätherische Öl nach den Angaben von F. Neuwald durch Aussalzen eines Wasserdampfdestillates der Droge und Ausschütteln mit Äther, in dem auch wesentlich hydrophilere Substanzen löslich sind, erhalten. Dies könnte weiter die von demselben Autor beschriebene höhere Ausbeute (ca. das Zehnfache) an ätherischem Öl für die Wurzeldroge erklären (siehe S. 4). Die Möglichkeit besteht, daß Spinosin in dem mit Hilfe der Karlsruher Apparatur gewonnenen ätherischen Öl nicht und wenn - nur in geringer Menge vorhanden ist. Weitere Untersuchungen sind zur Klärung dieser Frage erforderlich.

4. GC-massenspektroskopische Untersuchungen der ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut der Droge nach Abtrennen saurer und basischer Anteile sowie der Kohlenwasserstoff-Fraktion

Zur Aufnahme von Massenspektren sind in der Regel Reinsubstanzen erforderlich. Durch Kombination mit der Gaschromatographie wird jedoch auch die Untersuchung komplexer Stoffgemische, sofern diese gaschromatographisch getrennt werden können, möglich.

Ein Massenspektrometer wird anstelle des gaschromatographischen Detektors eingeschaltet, so daß von jeder aus der Säule austretenden Substanz in wenigen Sekunden ein Massenspektrum angefertigt werden kann.

Die Identifizierung einzelner Komponenten unserer ätherischen Öle allein durch Vergleich ihrer Retentionszeiten erschien zu schwierig und unzuverlässig, nachdem die Gaschromatogramme trotz Vortrennung (siehe S. 17) ein recht komplexes Stoffgemisch gezeigt hatten. Weiter war eine präparativ-gaschromatographische Isolierung einzelner Substanzen infolge der geringen Menge des zur Verfügung stehenden ätherischen Öles (0,02 % der getrockneten Wurzeldroge bzw. 0,028 % der getrockneten Krautdroge) kaum erfolgversprechend. Daher wurde die Identifizierung einzelner Komponenten durch Vergleich der Massenspektren mit den Angaben in der Literatur sowie durch Aufnahme von Gaschromatogrammen und Massenspektren authentischer Substanzen durchgeführt.

Für die GC-massenspektroskopischen Untersuchungen verwendeten wir die durch sechsstündige Destillationsdauer gewonnenen ätherischen Öle der vom Balkan stammenden Wurzeldroge sowie der in Marburg/Lahn kultivierten Krautdroge. Um eine Vortrennung zu erreichen, befreiten wir zunächst die ätherischen Öle von sauren und basischen Anteilen und trennten die Kohlenwasserstoff-Fraktion durch Säulenchromatographie an Kieselgel H ab (J.G.Kirchner und J.M.Miller, 1952). Der verbleibende Anteil wurde dann - zwecks weiterer Auftrennung und Reinigung - im Kugelrohr destilliert (Houben-Weyl, 1959). Dabei gingen beim ätherischen Öl der Wurzeln bei einem Druck von 0,2 Torr zwischen 70 und 80°C (Luftbadtemperatur) eine farblose sowie zwischen 110 und 150°C eine hellgelbe Fraktion über. Zurück blieb ein bis 230°C nicht destillierbarer Rückstand.

Beim ätherischen Öl aus dem Kraut gewannen wir bei einem Druck von 0,2 Torr zwischen 100 und 110°C (Luftbadtemperatur) eine hellgelbe Fraktion. Der verbleibende Rückstand konnte auch durch Erhitzen bis 230°C nicht übergetrieben werden.

Die Massenspektren dieser Fraktionen zeigten, daß Teile der (zwecks Vermeiden von Schaumbildung während der Wasserdampfdestillation) zugesetzten Silikon-Antischaumemulsion M-30 (Fa.Serva, Heidelberg) in die ätherischen Öle bzw. ihre Fraktionen übergegangen waren, wodurch Gipfel der zu untersuchenden Massenspektren überlagert und verfälscht wurden.

Zu beobachten waren u. a. charakteristische Bruchstücke bei m/e 73 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), die von um ein und zwei Masseneinheiten größeren Signalen mit wesentlich geringerer Intensität begleitet wurden. Dieses typische Bild wird durch das natürlich vorkommende Isotopenverhältnis des Siliciums (92,3 % ^{28}Si , 4,7 % ^{29}Si sowie 3,0 % ^{30}Si) verursacht.

So sahen wir uns gezwungen, frisches ätherisches Öl durch Wasserdampfdestillation ohne Zugabe der Silikon-Antischaumemulsion M-30 zu gewinnen, wobei langsam und vorsichtig erhitzt und übermäßige Schaumbildung durch leichtes Bewegen des Kolbens sowie tropfenweiser Wasserzugabe während der ersten Stunde der Destillation verhindert werden mußte. Die Destillationsdauer betrug wiederum sechs Stunden. Nachdem wir die ätherischen Öle - wie oben beschrieben - vorbereitet hatten, wendeten wir uns erneut den eigentlichen Untersuchungen mit Hilfe der GC-Massenspektrometrie zu.

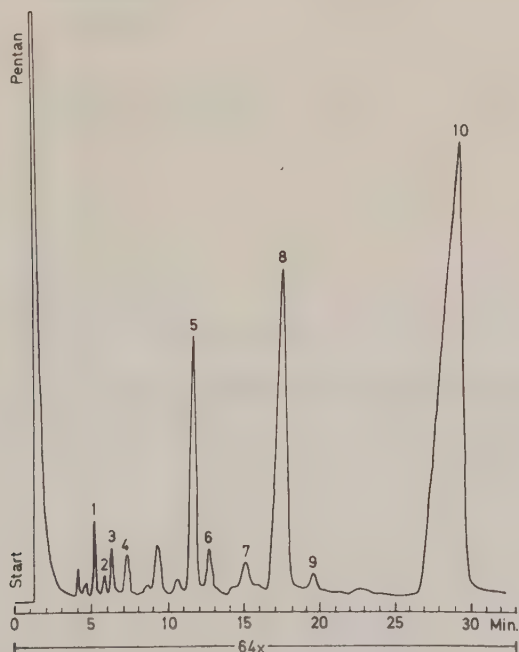


Abb. 16: Gaschromatogramm der ersten Siedefraktion des ätherischen Öles aus den Wurzeln von *Ononis spinosa* L. nach Abtrennen der Kohlenwasserstoffe, Säuren und Basen.

In der ersten Siedefraktion des ätherischen Wurzelöles konnten nahezu alle gaschromatographischen Banden aufgeklärt werden. Abb.16 gibt das Gaschromatogramm dieser Fraktion wieder. Alle identifizierten Verbindungen zeigen ihr charakteristisches Massenspektrum und können so zugeordnet werden. Nachfolgend eine tabellarische Übersicht (Tab.4) sowie die Beschreibung dieser für *Ononis spinosa* L. erstmals identifizierten Substanzen:

Tabelle 4: Identifizierte Substanzen der ersten Siedefraktion des ätherischen Öles aus den Wurzeln von *Ononis spinosa* L.

GC-Bande Nr.	identifizierte Substanzen des ätherischen Öles aus Radix Ononidis
1	Menthon
2	Isomenthon
3	Campher
4	Linalool
5	Menthol
6	Estragol
7	Borneol
8	Carvon
9	cis-Anethol
10	trans-Anethol

GC-Bande Nr. 1 zeigt Menthon und GC-Bande Nr. 2 Isomenthon an. Die dazugehörigen Massenspektren sind in Abb. 17 bzw. 18 dargestellt.

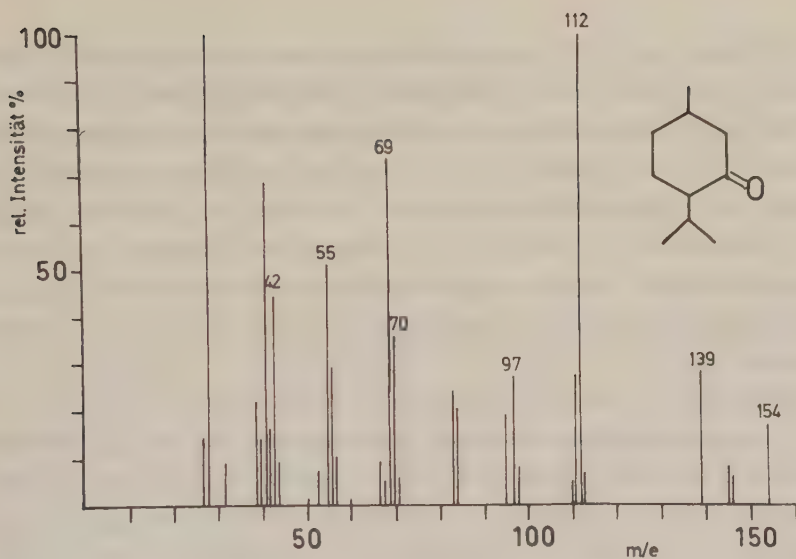


Abb.17: Massenspektrum von Menthon ($C_{10}H_{18}O$).

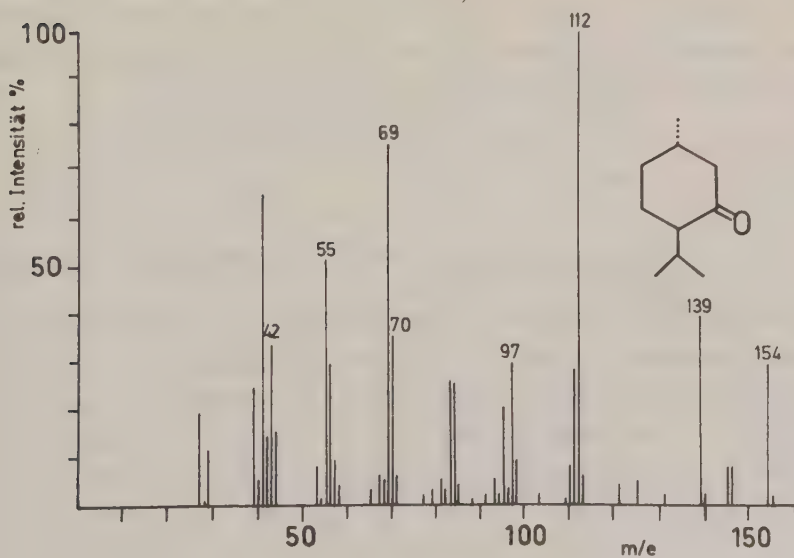
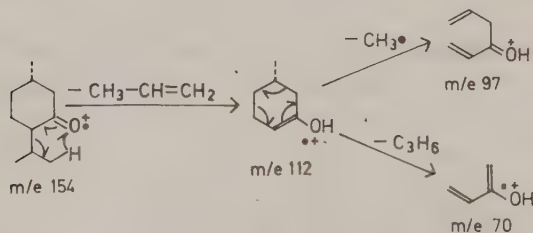


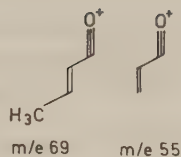
Abb.18: Massenspektrum von Isomenthon ($C_{10}H_{18}O$).

Beide Spektren sind mit der Ausnahme identisch, daß in Menthon das M^+ -Ion meßbar stabiler als in Isomenthon ist. Die Berechnung (G. Spitteller, 1966) wird derart durchgeführt, daß die Intensitätswerte aller Ionen von der Massenzahl 1 bis zum Molekulargewicht M summiert werden. Da mit der Aufnahme eines Spektrums selten unter der Masse 15, oft jedoch darüber begonnen wird, ist es üblich, die Anteile der Ionen niedriger Massenzahlen zu vernachlässigen. Als Bezugseinheit wählten wir die Gesamtionenmenge der über der Masse 26 liegenden Ionen und erhielten für die Molekülionen von Menthon und Isomenthon die Spitzenintensitäten von 3,75 % bzw. 2,38 % der totalen Ionisation $\Sigma 27$.

In beiden Spektren erscheint das Molekülion M^+ bei der berechneten Massenzahl m/e 154. Die Abspaltung einer Methylgruppe, nach Angaben in der Literatur (B. Willhalm und A. F. Thomas, 1965) aus der Isopropyl-Seitenkette, führt zum Signal m/e 139. Charakteristisch ist die stärkste Spitze der Spektren m/e 112, die durch eine McLafferty-Umlagerung aus dem Molekülion entstanden ist. Als cyclisches Keton mit einem α -Alkyl-Substituenten verfügt Menthon bzw. Isomenthon über ein γ -Wasserstoffatom, das von der Isopropylgruppe zum Sauerstoff wandert, wobei gleichzeitig Propylen abgespalten wird ($M - 42 = m/e$ 112). Durch anschließende Eliminierung einer Methylgruppe wird Fragment m/e 97 (m/e 112 - 15 = m/e 97) gewonnen. Weiter entstehen aus dem Bruchstück m/e 112 unter Abspaltung von C_3H_6 durch eine Retro-Diels-Alder-Reaktion die Ionen m/e 70 sowie 42 (m/e 112 - 42 = m/e 70).



Schließlich sei Signal m/e 69 erwähnt, das durch eine für cyclische Ketone typische Zerlegung entsteht und ein höheres Homologes der ebenfalls vorhandenen Spitze bei m/e 55 darstellt.



Bei der GC-Bande Nr. 3, deren Massenspektrum in Abb.19 wiedergegeben ist, handelt es sich um Campher.

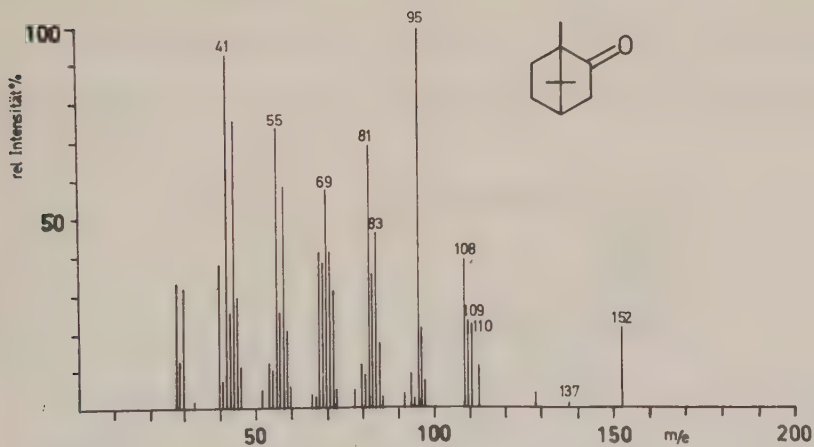


Abb.19: Massenspektrum von Campher ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$).

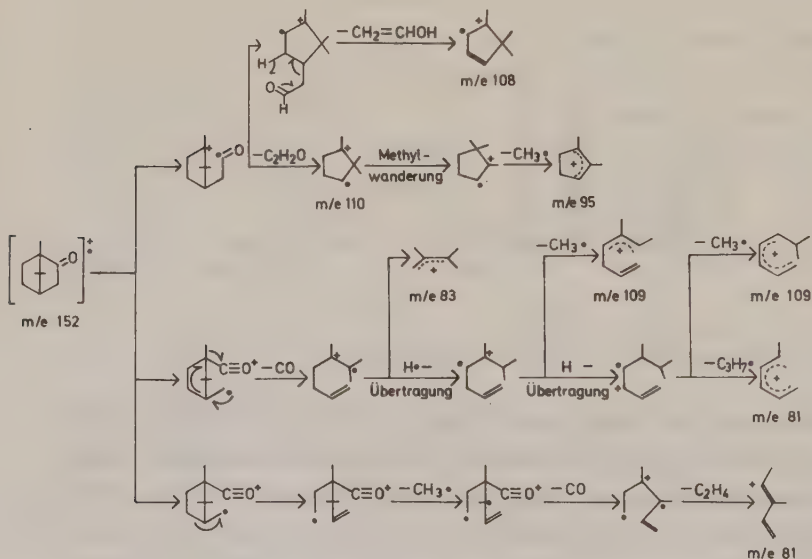
Als bicyclisches Terpen zeigt Campher einige für Cyclohexanone typische Fragmentierungen, jedoch können hier im allgemeinen die Fragmentierungsmuster weniger leicht verallgemeinert werden. Das Molekülion M^+ erscheint bei der berechneten Massenzahl m/e 152. Durch Abspaltung einer CH_3 -Gruppe erhalten wir eine Spitze bei m/e 137, die in unserem Spektrum nur sehr geringe Intensität zeigt (siehe E.v. Sydow, 1964).

Der Verlust von Keten aus dem Molekülion M^+ führt zu Ion m/e 110 ($M - 42 = m/e$ 110) und durch darauffolgende Abspaltung einer CH_3 -Gruppe nach vorheriger Methylwanderung zu m/e 95, dem stärksten Signal des Spektrums (m/e 110 - 15 = m/e 95).

Bruchstück m/e 108 wird durch Eliminierung einer $-CH_2CHOH$ -Gruppe aus dem Molekülion erhalten.

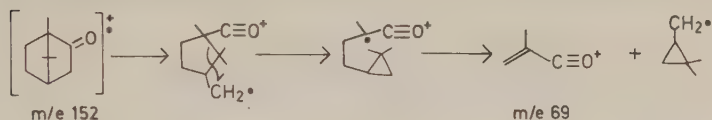
Durch Abspalten einer CO-Gruppe aus dem Molekülion sowie darauffolgender Eliminierung einer Methylgruppe entsteht ein Signal bei m/e 109 ($M - 28 - 15 = m/e$ 109). Ein weiteres Fragment, m/e 83, dürfte durch Bildung eines Hexenylkations nach Verlust der CO-Gruppe hervorgerufen werden.

Die Abspaltung einer CH_3 -Gruppe, von CO und C_2H_4 aus dem Molekülion führt zu einem Bruchstück bei m/e 81 ($M - 15 - 28 - 28 = m/e$ 81), das starke Intensität aufweist (D.S. Weinberg und C. Djerassi, 1966).



Des weiteren ist ein Ion bei m/e 69 zu beobachten. Dieses soll nach D.R.Dimmel und J.Wolinsky (1967) auf ein Fragment mit einem Sauerstoff- und vier Kohlenstoff-atomen zurückzuführen sein, das durch eine für cyclische Ketone und Alkohole charakteristische Trennung entstanden ist. Durch weitere Eliminierung einer CO-Gruppe kann das Signal bei m/e 41, das in unserem Spektrum die zweitstärkste Intensität aufweist (m/e 69 - m/e 28 = m/e 41), erklärt werden.

Typisch für die Fragmentierungen cyclischer Ketone ist der starke Gipfel bei m/e 55.



In Abb.20 ist das zur GC-Bande Nr. 4 gehörige Massenspektrum von Linalool dargestellt.

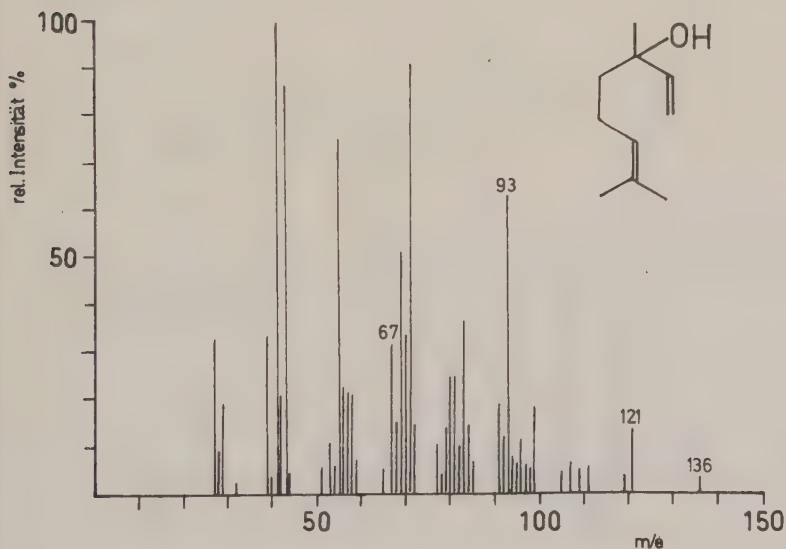


Abb.20: Massenspektrum von Linalool ($\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$).

Durch die leichte Abspaltbarkeit von Wasser bei Monoterpen-Alkoholen wird in diesem Spektrum das Moleküllion $M^+ = m/e$ 154 nicht angezeigt. Dieses kann aus den Signalen $M - 18 = m/e$ 136 sowie $M - 18 - 15 = m/e$ 121, die durch Abspaltung von H_2O bzw. H_2O und einer CH_3 -Gruppe entstanden sind, rechnerisch ermittelt werden. Die Bruchstücke m/e 136 und m/e 121 weisen zudem darauf hin, daß das vorliegende Spektrum einen Monoterpen-Alkohol darstellt.

Charakteristisch ist das Signal bei m/e 93, das durch Eliminierung der Isopropylgruppe aus m/e 136 unter Mitwirkung einer Mc Lafferty-Umlagerung entstanden ist.

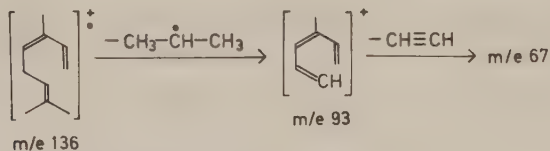


Abb. 21 gibt das zur GC-Bande Nr. 5 gehörige Massenspektrum von Menthol wieder.

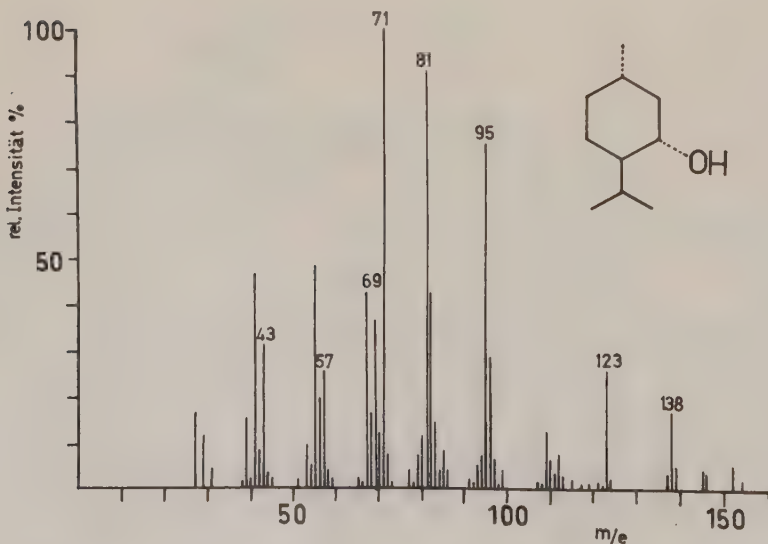
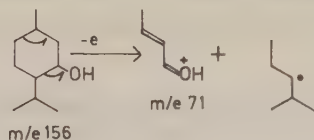
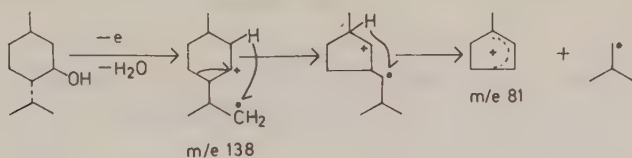


Abb. 21: Massenspektrum von Menthol ($C_{10}H_{22}O$).

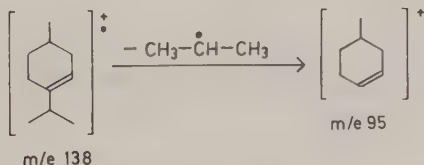
Wie bei Linalool erscheint im Spektrum von Menthol wegen der leichten Abspaltbarkeit von Wasser ebenfalls kein Molekülion. Dieses kann aus den Bruchstücken $M - 18 = m/e\ 138$ sowie $M - 18 - 15 = m/e\ 123$, die durch Eliminierung von Wasser bzw. Wasser und einer Methylgruppe entstanden sind, errechnet werden. Die Bildung des Bruchstückes $m/e\ 71$ stellt den Hauptfragmentierungsprozeß dieser Substanz dar, was dadurch erklärt werden kann, daß zwischen den Kohlenstoffatomen 3 und 4 eine Spaltung durch den Isopropylsubstituenten begünstigt wird (H. Budzikiewicz, C. Djerassi, D. H. Williams, 1967).



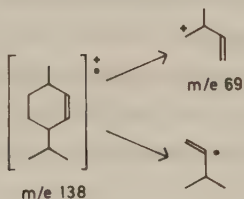
Das zweitstärkste Signal liegt bei $m/e\ 81$ und kann durch Spaltung des Bruchstückes $m/e\ 138$ in $m/e\ 81$ sowie $m/e\ 57$ erzeugt werden (E. v. Sydow, 1963; A. F. Thomas und B. Willhalm, 1966).



Durch Eliminierung der Isopropylgruppe aus dem Fragment $m/e\ 138$ entsteht $m/e\ 95$, die drittstärkste Spitze des Spektrums ($m/e\ 138 - 43 = m/e\ 95$).



Zu erwähnen ist noch die Spaltung des Ions m/e 138 in m/e 69 (m/e 138 - 69 = m/e 69).



GC-Bande Nr. 6 konnte an Hand typischer Fragmentierungen als Estragol identifiziert werden (siehe Abb. 22).

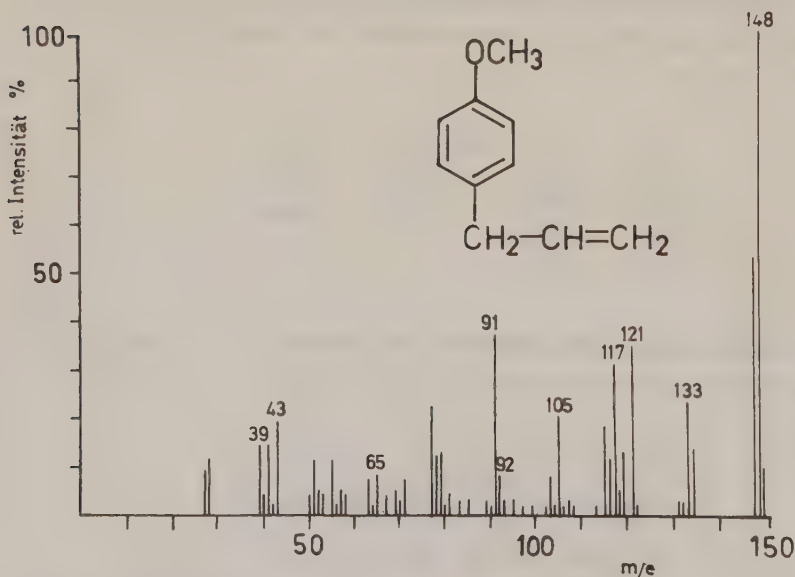
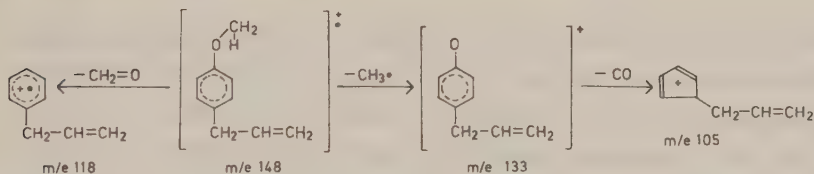
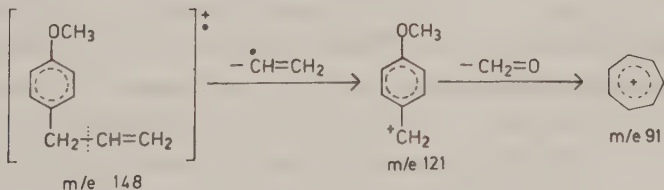


Abb. 22: Massenspektrum von Estragol ($C_{10}H_{12}O$).

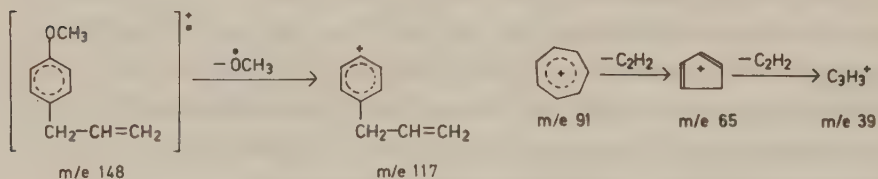
Ein erster Hinweis wurde durch die Schlüsselbruchstücke m/e 39 (C_3H_3) sowie m/e 65 (C_5H_5), die beide auf Aromaten deuten, gegeben. Charakteristisch (D.H.Williams und I.Fleming, 1968; H.Budzikiewicz, C.Djerassi, D.H.Williams, 1967) für das Vorhandensein eines aromatischen Methyläthers sind die Signale m/e 133, entstanden durch Abspaltung der Methylgruppe ($M - 15 = m/e$ 133), sowie m/e 105, gebildet durch anschließende Eliminierung von Kohlenmonoxid ($M - 15 - 28 = m/e$ 105). Es entsteht ein Cyclopentadienyl-Kation. Die ebenfalls für aromatische Methyläther typische Abspaltung von Formaldehyd führt zu der Spitze m/e 118 ($M - 30 = m/e$ 118), die in unserem Spektrum allerdings nur geringe Intensität zeigt.



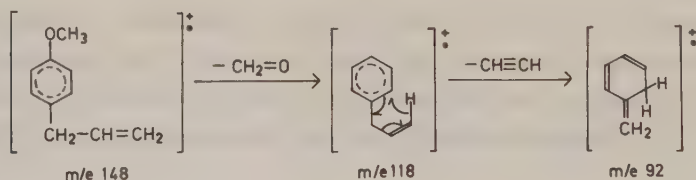
Das Vorhandensein einer Allylgruppe neben einem aromatischen Methyläther wird durch das Bruchstück m/e 121 angegeben, das durch die begünstigte β -Spaltung des Allylbenzols entstanden ist ($M - 27 = 121$). Auch Fragment m/e 91, durch typische Formaldehyd-Eliminierung unter Bildung des Tropylium-Kations erzeugt, ist zu beobachten ($M - 27 - 30 = m/e$ 91). Beide Bruchstücke besitzen annähernd gleiche Intensität,



Weiter sei auf das Ion m/e 117, entstanden durch Abspaltung der Methoxygruppe ($M - 31 = m/e$ 117), sowie m/e 39, gebildet durch Eliminierung von Acetylen aus dem Cyclopentadienyl-Kation (m/e 65 - 26 = m/e 39), hingewiesen.



In der Literatur (D.H. Williams und I. Fleming, 1968) wird beschrieben, daß alle in einer Seitenkette drei oder mehr C-Atome tragende Benzole eine β -Spaltung unter gleichzeitiger Wasserstoff-Umlagerung durchführen. Dieser Zerfall ist für Signal m/e 92, das als Ion des Methylcyclohexadiens formuliert werden kann, verantwortlich. In unserem Spektrum sind Signale bei m/e 118 sowie m/e 92 zu erkennen, deren Intensität allerdings recht gering ist (m/e 118 - 26 = m/e 92).



Das Molekülion M^+ erscheint bei der berechneten Massenzahl m/e 148 und stellt die stärkste Spitze des Spektrums dar.

Das Massenspektrum von Borneol, das sich auf GC-Bande Nr. 7 bezieht, ist in Abb.23 wiedergegeben.

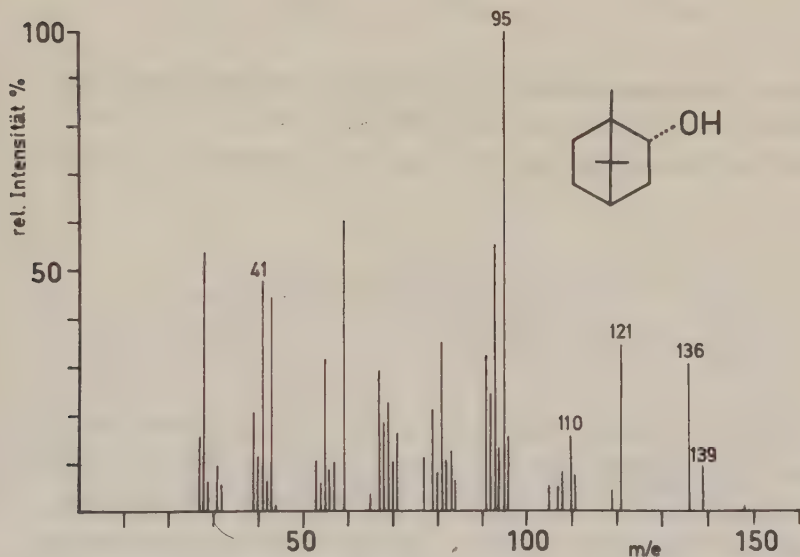
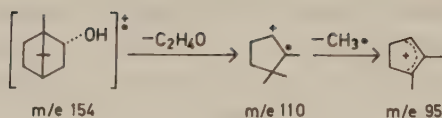


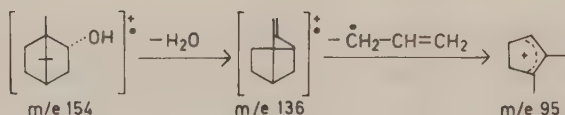
Abb.23: Massenspektrum von Borneol ($C_{10}H_{18}O$).

Bei der berechneten Massenzahl m/e 154 wird das Molekülion M^+ nicht angezeigt. Dieses kann jedoch durch die Signale m/e 139 ($M - 15 = m/e$ 139), m/e 136 ($M - 18 = m/e$ 136) sowie m/e 121 ($M - 15 - 18 = m/e$ 121), die durch Abspaltung einer Methylgruppe, von Wasser bzw. einer Methylgruppe und Wasser entstanden sind, errechnet werden. Das Fragment $M - 18$ weist ferner darauf hin, daß es sich bei der vorliegenden Verbindung um einen Alkohol handelt.

Die Eliminierung von C_2H_4O unter gleichzeitiger Umlagerung der C-9-Methylgruppe führt zu einem Bruchstück bei m/e 110 ($M - 44 = m/e$ 110), aus dem durch darauf folgende Abspaltung einer Methylgruppe Fragment m/e 95 entsteht (m/e 110 - 15 = m/e 95) (D.R.Dimmel und J.Wolinsky, 1967). Dieses zeigt die größte Intensität des Spektrums.



Eine weitere Entstehungsmöglichkeit der Spitze m/e 95 dürfte die Eliminierung von Wasser und eines Propenyl-Radikals aus M^+ sein ($\text{M} - 18 - 41 = \text{m/e } 95$), wofür auch das intensive Signal bei m/e 41 spricht (D.R.Dimmel und J.Wolinsky, 1967).



Alle weiteren Bruchstücke wie m/e 43, 55, 59, 69, 81 und 82 gehören, wie aus unserem Vergleichsspektrum und der Literatur (E.v.Sydow, 1963) hervorgeht, nicht zu Borneol sondern zu einer anderen, bislang nicht identifizierten Substanz des ätherischen Wurzelöles. Offensichtlich handelt es sich hier um zwei sehr eng beisammenliegende Substanzen, die nicht getrennt werden können. Dies zeigt auch die GC-Bande, die breiter ist, als es ihrer Retentionszeit entspricht.

GC-Bande Nr. 8 beinhaltet Carvon; das dazugehörige Massenspektrum ist in Abb. 24 wiedergegeben.

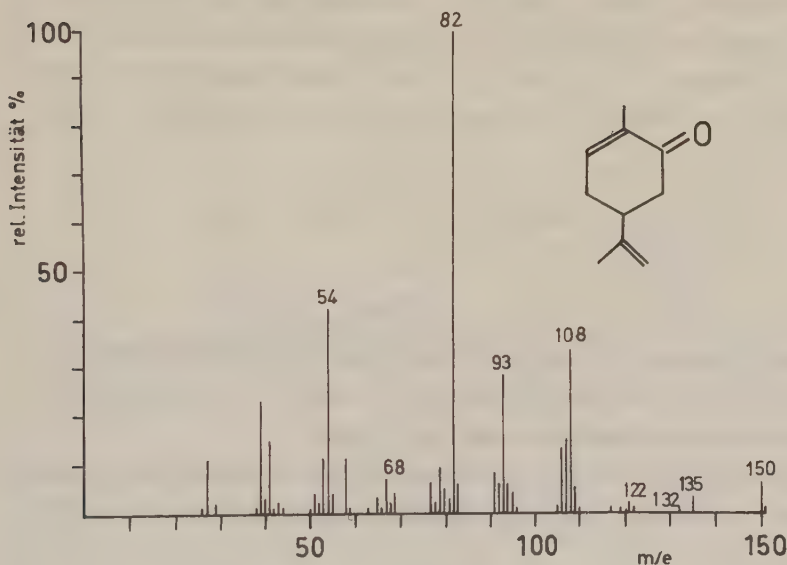
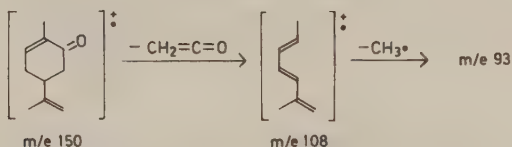


Abb. 24: Massenspektrum von Carvon ($C_{10}H_{14}O$).

In diesem Spektrum erscheint das Molekülion M^+ bei der berechneten Massenzahl m/e 150, weist jedoch nur geringe Intensität auf. Durch Abspaltung einer Methylgruppe entsteht das ebenfalls schwache Signal m/e 135 ($M - 15 = m/e 135$).

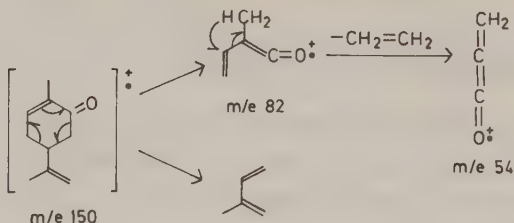
Charakteristisch (E.v. Sydow, 1964) für monocyclische Ketone und eine Unterscheidungsmöglichkeit zu monocyclischen Aldehyden und Alkoholen ist das äußerst kleine Bruchstück $M - 18$ ($= m/e 132$), das durch Eliminierung eines Wassermoleküls aus dem Molekülion erzeugt wird. Fragment m/e 122 ($M - 28 = m/e 122$) könnte durch Abspaltung von Kohlenmonoxid oder Äthylen gebildet werden. Auch diese Spitzen zeigen nur schwache Intensität.

Massenspektren von Monoterpen-Ketonen enthalten häufig die Ionen $M - 42$ bzw. $M - 44$, während Kohlenwasserstoffe und Alkohole im allgemeinen die Bruchstücke $M - 43$ aufweisen (E.v.Sydow, 1964). Im vorliegenden Spektrum besitzt Signal m/e 108 drittstärkste Intensität; es ist durch Eliminierung von Keten aus dem Molekülion entstanden ($M - 42 = m/e$ 108). Durch darauffolgende Abspaltung einer Methylgruppe wird Fragment m/e 93 gebildet ($M - 42 - 15 = m/e$ 93).



Signal m/e 82, erzeugt durch Spaltung des Molekülions M^+ in die Bruchstücke m/e 82 sowie m/e 68, stellt die Hauptspitze des Spektrums dar. Dieser Schritt kann als eine Retro-Diels-Alder-Reaktion angesprochen werden.

Durch Eliminierung von Äthylen aus dem Fragment m/e 82 entsteht das Ion m/e 54 (m/e 82 - 28 = m/e 54), das die zweitstärkste Intensität des Spektrums beinhaltet.



Die GC-Banden Nr. 9 und 10 stehen für cis- bzw. trans-Anethol. Die Abb. 25 und 26 stellen die dazugehörigen Massenspektren dar.

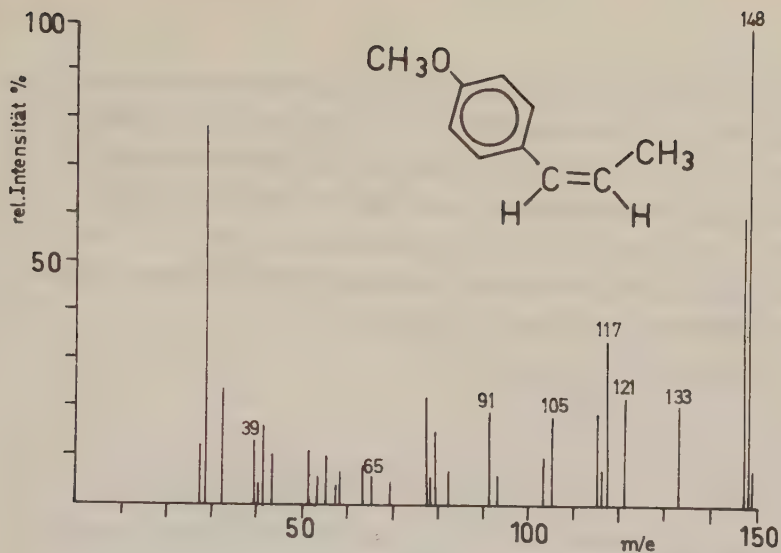


Abb. 25: Massenspektrum von cis-Anethol ($C_{10}H_{12}O$).

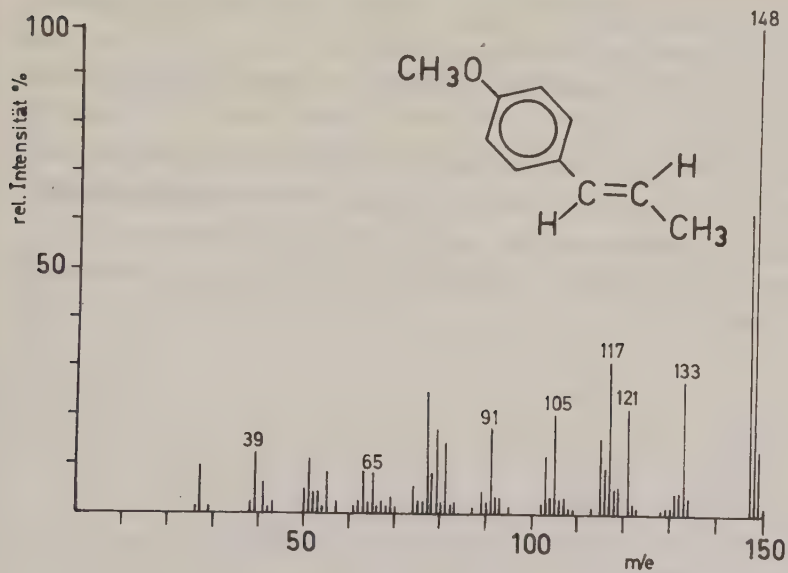


Abb. 26: Massenspektrum von trans-Anethol ($C_{10}H_{12}O$).

In beiden Spektren erscheinen die Molekülionen M^+ bei der berechneten Massenzahl m/e 148 und stellen die stärksten Signale dar. Durch die Schlüsselbruchstücke m/e 39 sowie m/e 65 (siehe S. 37) wird auch hier das Vorhandensein eines Aromaten angezeigt. Ansonsten enthalten beide Spektren annähernd die gleichen wie schon bei Estragol besprochenen Spitzen und Bruchstücke (siehe S. 37), die auf einen aromatischen Äther mit einer aus 3 C-Atomen gebildeten Seitenkette deuten. Folgende Bruchstücke und Signale sind zu beobachten:

$$M - 15 = m/e \ 133 - 28 = m/e \ 105$$

$$M - 27 = m/e \ 121 - 30 = m/e \ 91$$

$$M - 31 = m/e \ 117$$

$$(M - 30 = m/e \ 118 - 26 = m/e \ 92 \text{ nur bei trans-Anethol})$$

Alle Verbindungen konnten durch Aufnahme von Gaschromatogrammen und Massenspektren authentischer Substanzen eindeutig abgesichert werden.

In der zweiten Siedefraktion des ätherischen Wurzelöles konnten einzelne Substanzen bislang nicht eindeutig identifiziert werden. Alle zu den GC-Banden gehörenden Massenspektren deuten durch ihre Molekülionen zwischen 204 und 250 m/e auf höher molekulare Verbindungen, die größtenteils zu der Klasse der Sesquiterpene zählen dürften.

Die Untersuchung des ätherischen Krautöles, dessen Gaschromatogramm in Abb. 27 wiedergegeben ist, zeigte eindeutig, daß die ätherischen Wurzel- und Krautöle völlig unterschiedlich zusammengesetzt sind. Keine der in der ersten Siedefraktion des ätherischen Wurzelöles identifizierten Substanzen konnte im ätherischen Krautöl nachgewiesen werden.

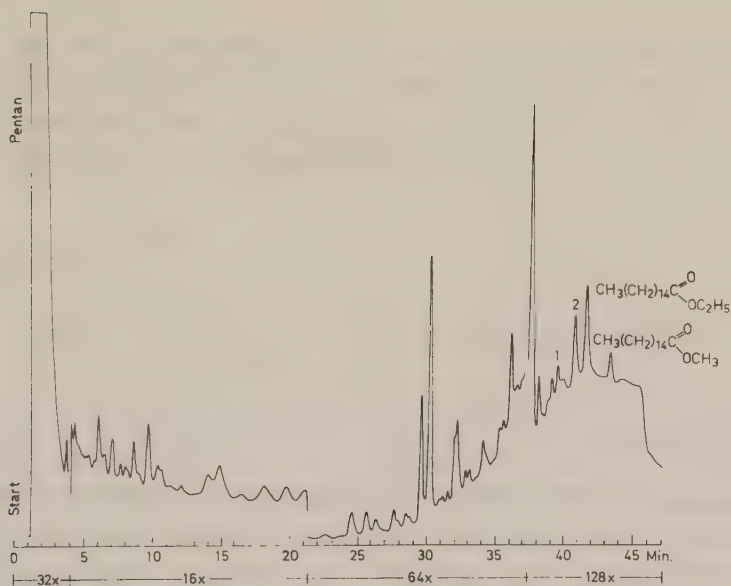


Abb. 27: Gaschromatogramm des ätherischen Öles aus dem Kraut von *Ononis spinosa* L. nach Abtrennen der Kohlenwasserstoffe, Säuren und Basen.

Dagegen wurden, abweichend von ätherischen Wurzelöl, im ätherischen Krautöl Palmitinsäuremethylester (siehe GC-Bande Nr. 1) sowie Palmitinsäureäthylester (siehe GC-Bande Nr. 2) gefunden. In Abb. 28 bzw. 29 sind die Massenspektren dieser Substanzen aufgeführt.

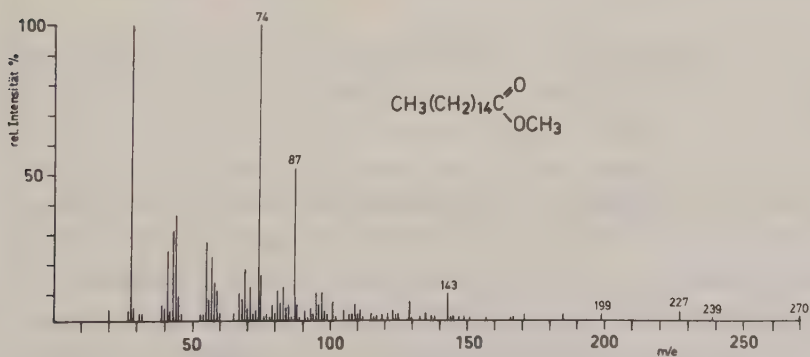


Abb. 28: Massenspektrum von Palmitinsäuremethylester ($C_{17}H_{34}O_2$).

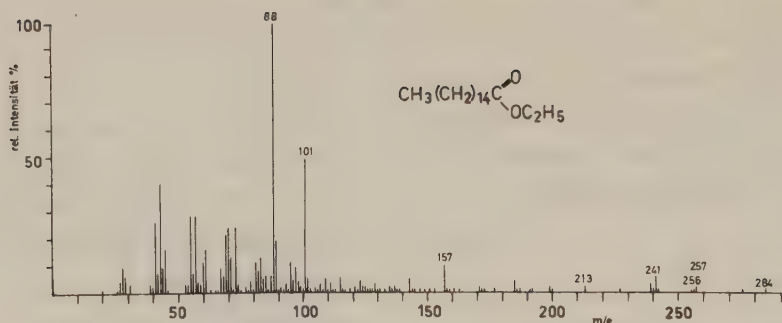
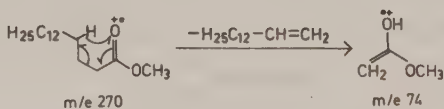


Abb. 29: Massenspektrum von Palmitinsäureäthylester ($\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$)

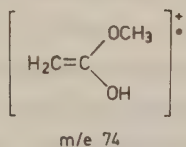
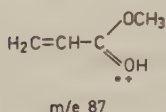
Die Massenspektren aliphatischer Ester sind eingehend untersucht worden, wobei vor allem die Arbeiten von Ryhage und Stenhagen (1963) zu erwähnen sind. Diese erbrachten den Nachweis, daß sich der Zerfall der Ester häufig über recht komplexe Umlagerungen, die auch heute noch nicht völlig zu durchschauen sind, vollzieht. Im Spektrum des Palmitinsäuremethylesters wird bei m/e 270 das schwach ausgeprägte Molekülion M^+ angezeigt.

Charakteristisch (H. Budzikiewicz, D. Djerassi, D.H. Williams, 1967) für das Vorhandensein eines Methylesters ist die Basis Spitze m/e 74. Diese entsteht durch eine bei Estern unverzweigter Carbonsäuren der C_6 - C_{26} -Reihe bevorzugten β -Spaltung unter Verschiebung eines γ -Wasserstoffatoms (Mc Lafferty-Umlagerung).



Die Produkte der Mc Lafferty-Umlagerung werden - ähnlich wie bei Säuren - von Schlüsselbruchstücken, die um m/e 13 schwerer sind, begleitet, was im vorliegenden Spektrum zu Signal m/e 87 führt. Nach G. Spiteller (1966) erbrachte die Untersuchung verschieden deuterierter Methylester nicht nur den Nachweis, daß bei der Mc Lafferty-Umlagerung ausschließlich Wasserstoffatome γ -ständiger CH-Gruppen

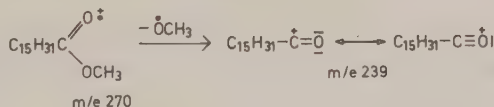
wandern, sondern zeigte auch, daß die um m/e 13 schwereren Begleitfragmente durch Verschiebung eines Wasserstoffatoms aus der zur funktionellen Gruppe α -ständigen CH-Gruppe sowie durch Wanderung eines zweiten, von einer δ - oder ϵ -ständigen CH-Gruppe stammenden Wasserstoffatoms entstehen.



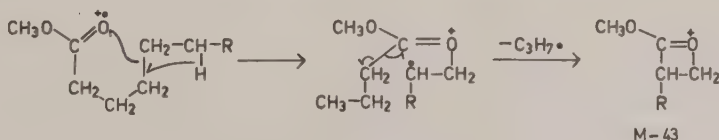
Die Spitzen des Produktes der McLafferty-Umlagerung und des um m/e 13 höher gelegenen Ions ermöglichen eine schnelle Ermittlung des Molgewichtes der Alkoholkomponenten eines Esters, sofern diese Komponente niedermolekular ist.

Auffallend sind die Differenzen von m/e 56, die auf Ionen der allgemeinen Formel $[(\text{CH}_2)_n \text{COOCH}_3]^+$ bei $n = 2, 6, 10$ usw. hinweisen. In unserem Spektrum wird dies durch die Signale bei m/e 87, m/e 143 sowie m/e 199 angezeigt.

Als weiteres charakteristisches Bruchstück (G. Spiteller, 1966) muß m/e 239 ($M - 31 = m/e$ 239), das durch Eliminierung der OCH_3 -Gruppe aus dem Molekölion entstanden ist, genannt werden.



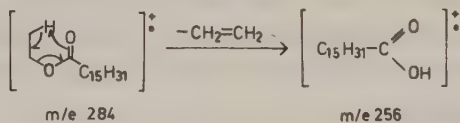
Häufig sind $M - 43$ -Ionen in den Spektren langer, geradkettiger Methylester anzutreffen (H. Budzikiewicz, D. Djerassi, D.H. Williams, 1967). Diese werden nicht durch Verlust der endständigen Propylgruppe, sondern im Zuge einer sehr komplexen Umlagerung aus der Mitte des Estermoleküls gebildet. Spitze m/e 227 ($M - 43 = m/e$ 227) zeigt im vorliegenden Spektrum nur geringe Intensität.



Das Spektrum des Palmitinsäureäthylesters, dessen schwach ausgeprägtes Molekülion M^+ bei der berechneten Massenzahl m/e 284 erscheint, zeigt die bereits bei Palmitinsäuremethylester beschriebenen charakteristischen Bruchstücke und Differenzen unverzweigter Carbonsäureester. So ist auch hier das Fragment $M - 43 = m/e$ 241 sowie die Differenz von m/e 56, die zu den Signalen m/e 101, m/e 157 und m/e 213 führt, anzutreffen.

Das durch β -Spaltung unter Verschiebung eines γ -Wasserstoffatoms (Mc Lafferty-Umlagerung) entstandene Basision m/e 88 wird wiederum von einem um m/e 13 schwereren Schlüsselbruchstück, das zu der Spitze m/e 101 führt, begleitet.

Zudem sind im Spektrum des Palmitinsäureäthylesters die Fragmente m/e 256 und m/e 257 zu beobachten. Diese entstehen durch den für Ester von Äthanol bzw. höheren Alkoholen typischen Verlust des Alkylfragments vom alkoholischen Anteil unter Umlagerung von einem (m/e 256) bzw. zwei Wasserstoffatomen (m/e 257) (H. Budzikiewicz, D. Djerassi, D.H. Williams, 1967).



Nach dem Verseifen des Krautöles (siehe Experimenteller Teil, S.123) erhielten wir eine weitere Fraktion, deren Gaschromatogramm in Abb.30 wiedergegeben ist und die eine Vielzahl einzelner Komponenten enthält.

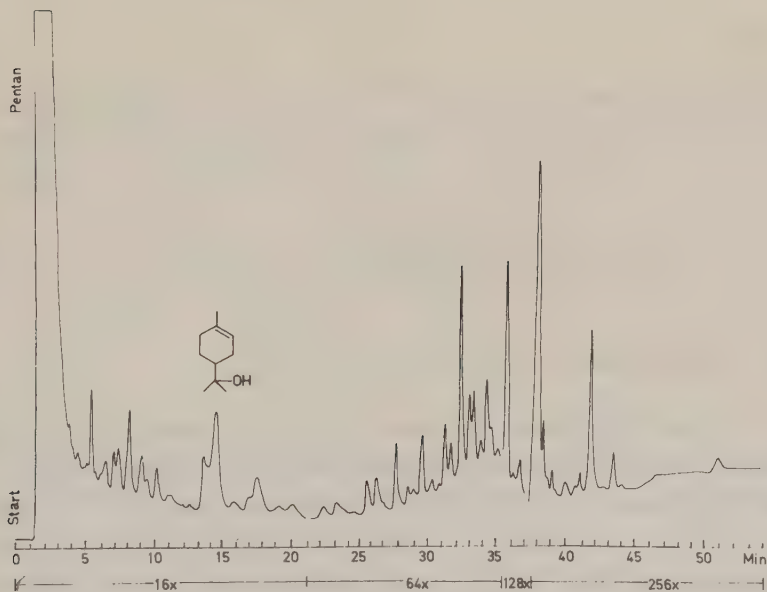


Abb.30: Gaschromatogramm des ätherischen Öles aus dem Kraut von *Ononis spinosa* L. nach Abtrennen der Kohlenwasserstoffe, Säuren und Basen sowie nach Verseifen.

Hiervon konnte α -Terpineol identifiziert werden. Abb.31 zeigt das Massenspektrum dieser Substanz.

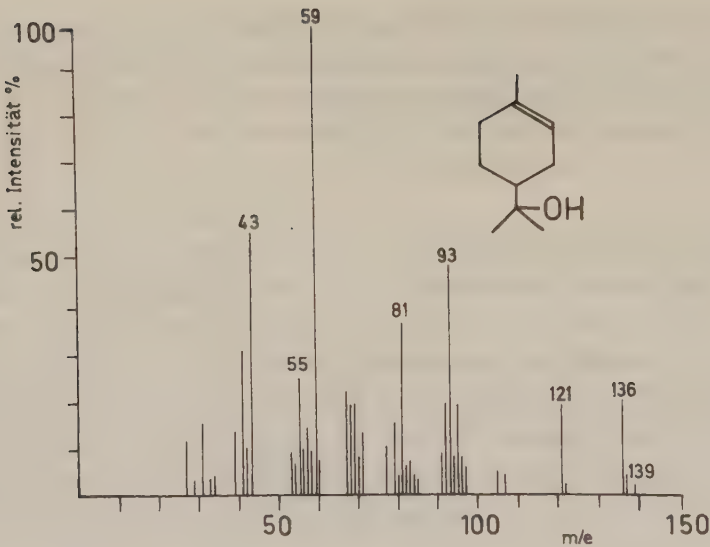
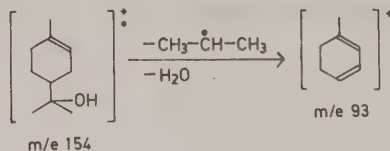


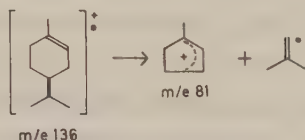
Abb.31: Massenspektrum von α -Terpineol ($C_{10}H_{18}O$).

Wie schon bei Linalool und Menthol beschrieben, wird auch im Spektrum von α -Terpineol wegen der leichten Abspaltbarkeit von Wasser kein Molekülion sichtbar. Es erscheinen die Bruchstücke m/e 139 ($M - 15 = m/e$ 139), m/e 136 ($M - 18 = m/e$ 136) und m/e 121 ($M - 18 - 15 = m/e$ 121), die durch Eliminierung einer Methylgruppe, von Wasser sowie von Wasser und einer Methylgruppe entstanden sind und zur Ermittlung des Molekülions herangezogen werden können.

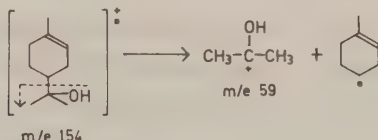
Die Abspaltung von Wasser sowie einer Isopropylgruppe aus dem Molekülion führt zu Signal m/e 93 ($M - 18 - 43 = m/e$ 93), das im vorliegenden Spektrum die drittstärkste Intensität zeigt. Noch stärker ausgeprägt ist Fragment m/e 43.



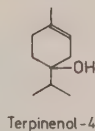
Spitze m/e 81 dürfte durch Spaltung des Bruchstückes m/e 136 in m/e 81 sowie m/e 55 entstanden sein (siehe Menthol, S. 35).



Der Hauptfragmentierungsprozeß von α -Terpineol wird durch Ion m/e 59 angezeigt. Er ist charakteristisch für diese Verbindung, deren Hydroxylgruppe mit der Isopropylgruppe verbunden ist (E.v.Sydow, 1963).



Terpinenol-4, das die diuretisch wirksame Komponente des ätherischen Wacholderöles darstellt (I.Janku et al., 1957), konnte nicht nachgewiesen werden. Die Massenspektren von α -Terpineol und Terpinenol-4 sind eindeutig zu unterscheiden (E.v.Sydow, 1963), wobei An- und Abwesenheit der Molekülionen sowie unterschiedliche m/e-Werte der Hauptsignale und abweichende Fragmentierungen zu nennen sind.



5. GC-massenspektroskopische Untersuchungen der Kohlenwasserstoffe der ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut der Droge

Die durch Säulenchromatographie an Kieselgel H (J.G.Kirchner und J.M.Miller, 1952) abgetrennten Kohlenwasserstoffe der ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut der Droge *) wurden ebenfalls - zwecks Reinigung - im Kugelrohr destilliert. Hierbei gingen bei einem Druck von 0,2 Torr die Kohlenwasserstoffe des ätherischen Wurzelöles zwischen 95 und 105°C , die Kohlenwasserstoffe des ätherischen Krautöles zwischen 100 und 110°C über. Die Gaschromatogramme dieser Kohlenwasserstoff-Fractionen zeigten mehr als 50 Banden, so daß die Identifizierung einzelner Substanzen allein durch Vergleich der Retentionszeiten unmöglich erschien und wiederum die direkte Kopplung von Gaschromatographie und Massenspektrometrie angewendet wurde.

Besonders charakteristisch waren die Massenspektren der aromatischen Kohlenwasserstoffe, auf deren Untersuchung wir uns beschränkten. In den Abb. 32 und 33 sind die Gaschromatogramme der Kohlenwasserstoff-Fractionen der ätherischen Wurzel- und Krautöle dargestellt; die zu den jeweiligen GC-Banden gehörenden Substanzen sind in Tab.5 aufgeführt.

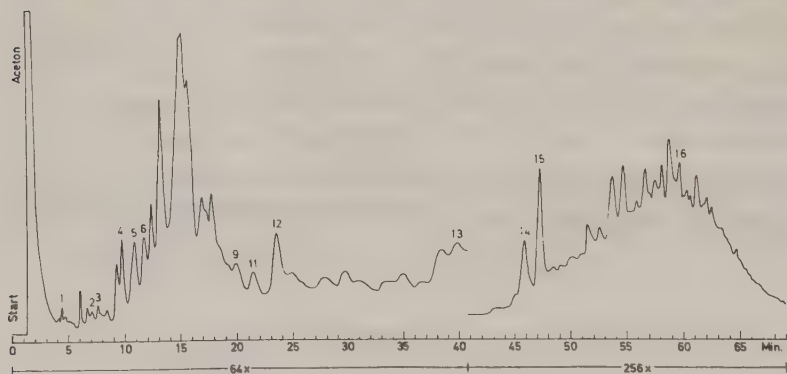


Abb.32: Gaschromatogramm der Kohlenwasserstoff-Fraktion des ätherischen Öles aus den Wurzeln von *Ononis spinosa* L.

*) Zur Verwendung gelangten die ohne Zusatz von Silikon-Antischaumemulsion frisch destillierten ätherischen Öle.

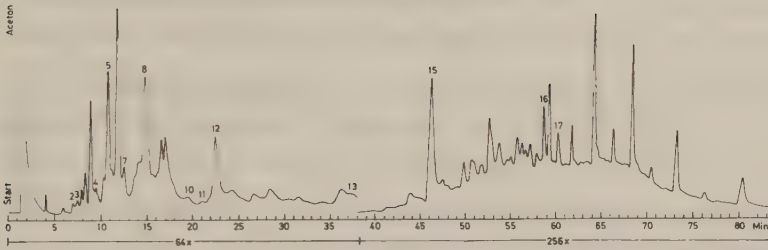


Abb.33: Gaschromatogramm der Kohlenwasserstoff-Fraktion des ätherischen Öles aus dem Kraut von *Ononis spinosa* L.

Tabelle 5: Identifizierte Substanzen der Kohlenwasserstoff-Fractionen aus Wurzel und Kraut von *Ononis spinosa* L.

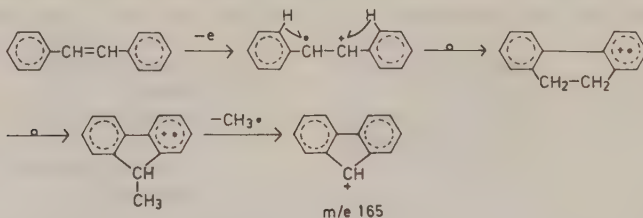
GC-Bande Nr.	identifizierte Substanzen der Kohlenwasserstoffe aus	
	Radix Ononidis	Herba Ononidis
1	Naphthalin	—
2	2-Methylnaphthalin	2-Methylnaphthalin
3	1-Methylnaphthalin	1-Methylnaphthalin
4	Diphenyl	Diphenyl
5	Dimethylnaphthalin	Dimethylnaphthalin
6	Dimethylnaphthalin	—
7	—	Dimethylnaphthalin
8	—	Acenaphthen
9	Trimethylnaphthalin	—
10	—	Trimethylnaphthalin
11	Trimethylnaphthalin	Trimethylnaphthalin
12	Fluoren	Fluoren
13	Stilben	Stilben
14	Hexachlorcyclohexan	—
15	Phenanthren	Phenanthren
16	Fluoranthren	Fluoranthren
17	—	Pyren

Die Banden 5, 6 und 7 enthalten nach den Massenspektren neben den isomeren Dimethylnaphthalinen noch weitere Verbindungen, die nicht identifiziert werden konnten.

Aus Tabelle 5 geht hervor, daß es sich bei den von uns genannten Substanzen - abgesehen von Hexachlorcyclohexan, Stilben und Diphenyl - um polycyclische, aromatische Kohlenwasserstoffe handelt. Da hier größtenteils homologe Verbindungen vorliegen, sehen wir davon ab, jede Substanz einzeln zu diskutieren. Im folgenden sollen lediglich typische Fragmentierungen angesprochen werden:

Nach den Angaben in der Literatur (H.Budzikiewicz, C.Djerassi, D.H.Williams, 1967) zeigen Diphenyle nur spärliche Bruchstückbildung, wobei als Hauptfragment m/e 76 durch Ion $C_6H_4^+$ unter gleichzeitiger Bildung von neutralem Benzol entsteht. Ein kleineres Signal, das dem Ion $C_6H_5^+$ sowie dem zweifach geladenen Molekülion $C_{12}H_{10}^{++}$ zugeschrieben wird, ist bei m/e 77 zu beobachten.

Stilben weist auf Grund seines konjugierten Systems nur geringe Fragmentierung auf; hier erscheint der Verlust eines Methylradikals bemerkenswert (H.Budzikiewicz, C.Djerassi, D.H.Williams, 1967).

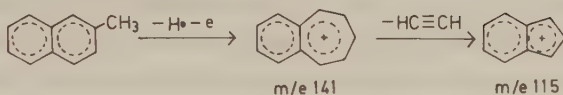


Es wird beschrieben (H.Budzikiewicz, C.Djerassi, D.H.Williams, 1967), daß über polycyclische, aromatische Kohlenwasserstoffe bis heute verhältnismäßig wenig gearbeitet worden ist. Als wesentliche Informationsquelle wird hier der API-Katalog genannt.

Unsubstituierte aromatische Kohlenwasserstoffe wie z.B. Naphthalin zeigen wiederum nur geringe Bruchstückbildung, wobei das $M - 1$ -Ion zu erwähnen ist.

Bei den alkylierten, polycyclischen Aromaten ist als Hauptfragmentierungsprozeß die β -Spaltung anzusprechen. Als Beispiel sei hier 2-Methylnaphthalin angeführt, das unter Verlust eines Wasserstoffatoms Signal m/e 141 sowie unter anschließender

Abspaltung von Acetylen Gipfel m/e 115 bildet.



Alle Substanzen wurden an Hand ihrer Molekülonen und Bruchstücke sowie deren Intensitätsverteilung identifiziert und überdies durch Zusatz der authentischen Substanzen zum ätherischen Öl und erneuter Gaschromatographie abgesichert.

Von den Kohlenwasserstoffen der aromatischen Reihe sind bislang nur wenige in Pflanzen gefunden worden (E.Gildemeister und F. Hoffmann, 1960). Daher ist zu vermuten, daß es sich bei den oben angesprochenen Verbindungen größtenteils um aus der Umwelt aufgenommene Substanzen und nicht um echte Inhaltsstoffe des ätherischen Öles handelt. Die Versuchsfelder des Institutes für Pharmazeutische Biologie in Marburg/Lahn liegen etwa 50 m neben einer stark befahrenen Straße, so daß die polycyclischen, aromatischen Kohlenwasserstoffe durch Abgase auf die Droge gelangt sein könnten. Der genaue Standort der vom Balkan stammenden Wurzeldroge konnte nicht bestimmt werden. Es ist nicht auszuschließen, daß die oben angesprochenen Substanzen durch Trocknen an offenen Feuerstellen auf die Droge übergegangen sind. Nach den Angaben in der Literatur (P.Karrer, 1959) sind im Steinkohlenteer außer Stilben alle von uns gefundenen Verbindungen anzutreffen. J.Kachler (1869) berichtet über das Vorkommen von Stilben im Perubalsam. Hydroxystilbene sind in der Familie der Pinaceae (G.Lindstedt u. A. Misiorny, 1951) sowie in verschiedenen Eucalyptus-Arten frei und glykosidisch gebunden vorzufinden (D.W.Hathway und J.W.T.Seakins, 1959; W.E.Hillis, 1966). Über das Vorkommen von unsubstituiertem Stilben in der Kohlenwasserstoff-Fraktion von *Alnus firma* Sieb. et Zucc. berichtet Y.Asakawa (1970), der eine Biosynthese dieses Kohlenwasserstoffes aus Shikimisäure und Acetat postuliert. Somit dürfte es sich bei dem in Wurzel und Kraut der untersuchten Droge nachgewiesenen Kohlenwasserstoff trans-Stilben um einen genuine Pflanzeninhaltsstoff handeln.

In verschiedenen ätherischen Ölen wird außerdem das Vorhandensein von Naphthalin (Storaxrindenöl und Nelkenstielöl von *Eugenia caryophyllata*, Irisöl von *Iris germanica*, Costuswurzelöl von *Saussurea lappa*, Birkenknospenöl, Öl von Reiskeimlingen) sowie Methylnaphthalin und Dimethylnaphthalin (Öl von Reiskeimlingen) beschrieben (W.Karrer, 1958), die als Pflanzeninhaltsstoffe angesprochen werden. Inwieweit es sich hierbei um echte Inhaltsstoffe oder aus der Umwelt aufgenommene Verunreinigungen handelt, kann nicht gesagt werden.

Eine abschließende Wertung unserer Ergebnisse ist erst nach weiteren Untersuchungen möglich.

Kein genuiner Inhaltsstoff ist sicher Hexachlorcyclohexan, das in der vom Balkan stammenden Wurzeldroge nachgewiesen wurde. Diese häufig als Insektizid verwendete Substanz dürfte durch Aufnahme der Pflanze aus der Natur (H.Beitz, F.Seefeld und F.Pank, 1973) oder durch Zusatz zur Droge gegen Insektenfraß in das ätherische Öl gelangt sein.

Abb.34 gibt das Massenspektrum von Hexachlorcyclohexan wieder.

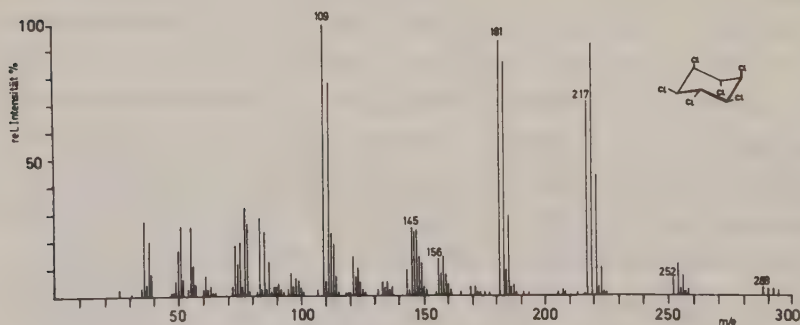


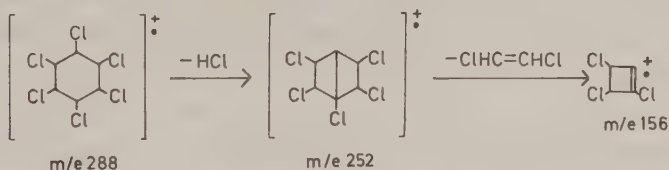
Abb.34: Massenspektrum von Hexachlorcyclohexan ($C_6H_6Cl_6$).

Aus dem Spektrum können auf Grund des bei chlorierten Verbindungen charakteristischen Isotopenverhältnisses eindeutig Aussagen über den Gehalt an diesen Atomen gemacht werden. Das Verhältnis der beiden Chlorisotope ^{35}Cl und ^{37}Cl beträgt 75,53 : 24,47, angenähert 3 : 1, so daß je nach Anzahl der im Molekülion bzw. Bruchstück enthaltenen Chloratome mehrere sich um zwei Masseneinheiten unterscheidende Isotopensignale auftreten. Die Intensität dieser Spitzen kann an Hand des Binoms $(a + b)^n$ berechnet werden, wobei der Näherungswert $a : b = 3 : 1$ durch das Isotopenverhältnis $^{35}\text{Cl} : ^{37}\text{Cl}$ und n durch die Anzahl der Chloratome gegeben ist (G. Spiteller, 1966).

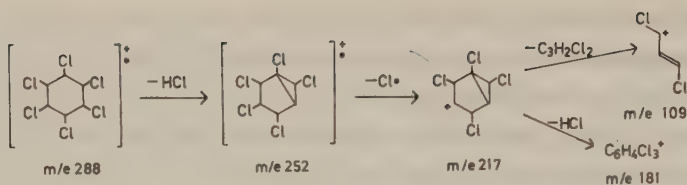
Das Molekülion M^+ erscheint bei der berechneten Massenzahl m/e 288 und wird von drei Isotopensignalen bei m/e 290, m/e 292 sowie m/e 294 begleitet. Von den zu erwartenden sechs Isotopenspitzen sind die beiden letzteren von so geringer Intensität, daß sie im abgebildeten Spektrum nicht mehr zu erkennen sind.

Vier Fragmentierungswege können hier für die Bildung der durch ihren Chlorgehalt definierten Fragmentionen formuliert werden (F. Moll und J. Heiß, 1969).

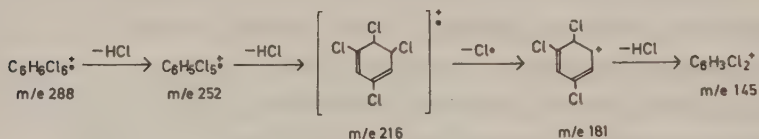
- 1) Das Bruchstück m/e 252 wird durch 1,4-Eliminierung unter Bildung eines Pentachlor-bicyclohexan-Ions erhalten, aus dem durch Abspaltung von Dichloräthylen Fragment m/e 156 entsteht.



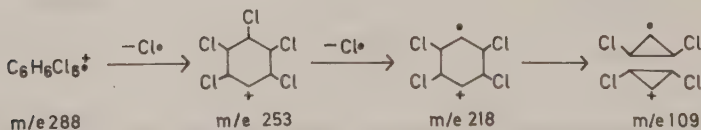
- 2) Durch 1,3-Eliminierung entsteht unter Bildung des Pentachlor-bicyclohexan-Ions aus dem Molekülion M^+ ein Signal bei m/e 252, aus dem durch Abspaltung eines Cl-Radikals Ion m/e 217 gewonnen wird. Bruchstück m/e 217 führt unter Chlorwasserstoff-Eliminierung zu Signal m/e 181 sowie durch Verlust eines C_3 -Fragmentes zu Ion m/e 109, das im vorliegenden Spektrum die größte Intensität aufweist.



- 3) Durch einen Fragmentierungsweg mit zwei aufeinanderfolgenden Chlorwasserstoff-abspaltungen unter 1,2-Eliminierung entsteht Ion m/e 216. Die weitere Abspaltung eines Chlor-Radikals führt zu Bruchstück m/e 181, aus dem durch darauffolgende Eliminierung von Chlorwasserstoff Ion m/e 145 gebildet wird.



- 4) In der Literatur (F.Moll und J.Heiß, 1969) wird durch doppelte Abspaltung von Chlor der geringe Anteil der Ionen m/e 253 und m/e 218 beschrieben. Diese werden in unserem Spektrum nicht mehr angezeigt. Durch Zerfall des Bruchstücks m/e 218 entsteht Ion m/e 109, das im vorliegenden Spektrum die stärkste Intensität aufweist.



Für Hexachlorcyclohexan (Gammexan[®], Lindan[®], Jacutin[®]) wurde eine quantitative Bestimmung unter Verwendung der Methode des inneren Standards durchgeführt (siehe S.125). Dabei fanden wir in der Fraktion der Kohlenwasserstoffe einen Gehalt von 0,8 % dieser Substanz. Hieraus läßt sich unter Berücksichtigung des ätherischen

Ölgehaltes der Wurzeldroge sowie dessen Anteil an Kohlenwasserstoffen ein Wert von 0,4 ppm an Gammexan für die Droge errechnen ^{*)}, wobei vorausgesetzt wird, daß die Gesamtmenge des Insektizids tatsächlich erfaßt werden konnte.

Für Infuse, die nach Vorschrift des Arzneibuches aus einem Teil Droge auf zehn Teile Aufguß zubereitet werden, ergibt sich somit ein Gehalt von 0,04 ppm.

Über die Problematik von Pestiziden bei Arzneipflanzen berichten ausführlich H. Friedrich und H.G.Büter (1974 u. 1975). Gesetzliche Vorschriften hinsichtlich erlaubter Höchstmengen bestehen bis heute nicht in der Bundesrepublik Deutschland. Daher wird von chemischen Landesuntersuchungsämtern empfohlen (siehe W.Groebel, 1972), sich hierbei an die Lebensmittelgesetzgebung anzulehnen. Als Vergleich zum Infus der untersuchten Wurzeldroge sei der in der Höchstmengenverordnung tierischer Lebensmittel vom 15. November 1973 angegebene höchstzulässige Gehalt an Gammexan in Milch betrachtet. Dieser beträgt 0,2 ppm bezogen auf den Fettgehalt, so daß bei dem in Milch üblichen Fettgehalt von 3,5 % ein Wert von 0,007 ppm errechnet wird. Somit ist das Infus, selbst unter Berücksichtigung, daß ein Teil des ätherischen Öles mit dem Wasserdampf während der Zubereitung entweicht, als problematisch anzusehen. Erschwerend erscheint zudem, daß ein kranker Organismus empfindlicher als ein gesunder reagiert (H. Friedrich und H.G.Büter, 1975) und daß Phytotherapeutika meist über einen längeren Zeitraum gegeben werden (R. Hänsel, 1975).

Eine wesentliche Aufgabe der Pharmakognosie besteht in der Identifizierung von Drogen sowie ihrer Prüfung auf Reinheit. Die Untersuchung der Kohlenwasserstoffe aus *Ononis spinosa* L. zeigte neben genuineen Pflanzeninhaltsstoffen aus der Umwelt aufgenommene Substanzen, die als bedenklich angesehen werden müssen und für die bestimmte Höchstmengen festgelegt werden sollten.

*) Bei mit Gammexan gespritzter Pfefferminze wurde nach zweimonatiger Wartezeit 0,4 ppm, nach drei- bis viermonatiger Wartezeit nur noch 0,01 ppm dieses Insektizids nachgewiesen (H. Friedrich und H.G.Büter, 1974); vergleiche auch den höchstzulässigen Gehalt von 0,1 ppm an Gammexan in Zuckerrüben (Höchstmengenverordnung Pflanzenschutz, pflanzliche Lebensmittel vom 5. Juni, 1973).

VI. Pharmakologische Untersuchungen

1. Aufgabenstellung

Wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit berichtet, ist die pharmakologische Wirkung der *Ononis spinosa* L. in der Literatur umstritten, wobei Art und Konzentration ihrer Zubereitung eine wesentliche Rolle spielen. Trotz zahlreicher Versuche an Mensch und Tier (Hund, Kaninchen, Meerschweinchen, Ratte und Maus) konnte bisher die Frage nach der diuretischen Wirksamkeit der Droge nicht eindeutig geklärt werden.

So beschreibt D. Cow (1912), daß ein Extr. Onon. aqu. fluid. beim Hund eine vermehrte Harnausscheidung hervorruft.

Von W. Buelow (1891, Selbstversuch), H. Vollmer und K. Hübner (1937, Ratte) sowie H. Vollmer und H. Hindemith (1937, Kaninchen und Maus) wird die Wurzeldroge in Form eines Dekoktes als diuretisch wirksam beurteilt. Diesem Ergebnis widersprechen die Befunde von R. Jaretsky und A. Sievers (1933, Selbstversuch), die den Dekokt der Wurzeldroge als diuretisch unwirksam, R. Jaretsky und F. Neuwald (1938, Ratte) sogar als diuresehemmend bezeichnen.

Nach I. Bulkowstein (1916, Selbstversuch) ist die diuretische Wirksamkeit des Wurzeldekoktes dosisabhängig. Der aus einem Teil Droge auf fünf Teile Wasser zubereitete Dekokt bewirkt keine vermehrte Harnausscheidung, während der aus einem Teil Droge und vierzig Teile Wasser hergestellte Dekokt eine Diuresesteigerung hervorruft.

Unterschiede zwischen Dekokten der Wurzeldroge (diuretisch unwirksam) und Dekokten der Krautdroge (diuretisch wirksam) werden von R. Jaretsky und A. Sievers (1933, Selbstversuch) beobachtet.

Dem Infus der Wurzeldroge wird von E. Herre (1937, Ratte) sowie von R. Jaretsky und F. Neuwald (1938, Ratte) eine diuresesteigernde, von K. Lotz (1923, Selbstversuch) eine diuretisch indifferente und von Th. Hehenkamp (1923, Selbstversuch) bei einem Ansatz von einem Teil Droge auf fünf Teile Wasser eine diuresehemmende Wirkung zugesprochen. Auch Th. Hehenkamp (1923, Selbstversuch) kann von einer Dosisabhängigkeit berichten, da er mit dem Infus der Wurzeldroge bei einem Ansatz von einem Teil Droge auf zehn Teile Wasser keinen Einfluß auf die Harnausscheidung nehmen kann.

Ein von R.Jaretzky und F.Neuwald (1938) hergestelltes Ononis-Destillat zeigte im Tierversuch (Ratte) diuretische Wirksamkeit, die auch durch klinische Prüfung bestätigt werden konnte (siehe R.Jaretzky und F.Neuwald, 1939). Nachdem das aus diesem Destillat gewonnene ätherische Öl in Form eines aromatischen Wassers (Herstellung nach Vorschrift des DAB 6 jedoch ohne Weingeistzusatz) eine vermehrte Harnausscheidung bewirkte, kamen R.Jaretzky und F.Neuwald (1938 u. 1939) schließlich auf Grund einer Reihe kritischer Untersuchungen zu dem Ergebnis, daß die dornige Hauhechel zwei gegensätzlich wirkende Komponenten enthalten müßte, eine mit Wasserdampf flüchtige Substanz, die die Diurese fördert, und eine nichtflüchtige, in Wasser schwerlösliche Substanz, die die Diurese hemmt.

Im Gegensatz dazu stehen die Versuchsergebnisse von H.Vollmer und A.Giebel (1938; siehe hierzu auch H.Vollmer, 1940), die eine diuretische Wirksamkeit der Droge vorwiegend nicht wasserdampf flüchtigen Inhaltsstoffen zuschreiben.

Im Zuge unserer Untersuchungen der ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut der dornigen Hauhechel griffen wir diese Ergebnisse auf, um die Wirksamkeit der ätherischen Öle im Tierversuch erneut kritisch zu prüfen, wobei die Versuchsergebnisse nach modernen statistischen Methoden abgesichert und durch Bestimmung der Na^+ -, K^+ - und Cl^- -Ionenkonzentrationen der ausgeschiedenen Harne erweitert werden sollten. Im Falle nachweisbarer diuretischer Wirksamkeit der ätherischen Öle sollte ferner die Fraktion bzw. Substanz, die die Wirkung beinhaltet, durch pharmakologische Prüfungen identifiziert oder näher charakterisiert werden.

Zudem veranlaßten uns die sich widersprechenden Aussagen in der Literatur sowie die Tatsache, daß die Wurzeln der dornigen Hauhechel im DAB 7 DDR und im ÖAB 9 offizinell und noch heute in Form wäßriger Zubereitungen medizinisch gebräuchlich sind, Infuse und Dekokte der Droge im Tierversuch auf ihre diuretische Wirksamkeit zu prüfen.

2. Beschreibung der Versuchsanordnung

Die Auswahl einer geeigneten Versuchsanordnung zur Durchführung von Diureseversuchen wird in der Literatur diskutiert. Probleme, die es hierbei zu lösen gilt, sollen im folgenden, bei der Beschreibung der von uns angewendeten Versuchsanordnung kurz aufgezeigt werden.

Die Grundlage unserer Versuchsanordnung war, die von Kontroll- und Versuchstieren innerhalb bestimmter Zeitabstände entleerten Harnmengen zu erfassen, ihren Gehalt an Na^+ , K^+ und Cl^- -Ionen zu bestimmen und die Werte miteinander zu vergleichen. Dazu mußte erreicht werden, daß zu Versuchsbeginn alle Tiere möglichst gleich stark "gewässert" waren und daß der während des Versuchs entleerte Harn quantitativ und ohne Verunreinigung durch Kotballen aufgefangen und abgemessen werden konnte. Problematisch war die zeitliche Begrenzung der einzelnen Versuche. Die sowohl von H. Vollmer und K. Hübner (1937) als auch von R. Jaretsky und F. Neuwald (1938) beschriebene Versuchsdauer von vier Stunden erschien als zu kurz bemessen, da Vorversuche zeigten, daß sich der Verlauf einer gesteigerten Diurese bei der Ratte über größere Zeiträume (mindestens sieben Stunden) erstreckt. Unsere Diureseversuche dauerten daher in der Regel vierundzwanzig, bei einem Teil der Versuche sieben Stunden. Während dieser Zeit saßen die Tiere nüchtern und unter Wasserentzug in Diuresekäfigen, in den Versuchspausen wurden sie in Makrolon-Käfigen, wo sie ad libitum fressen und saufen konnten, gehalten.

Vergleichende Untersuchungen, bei denen die Tiere vor Versuchsbeginn zwölf bis vierzehn Stunden nüchtern und unter Wasserentzug gesetzt wurden (siehe Versuchsanordnung von H. Vollmer und K. Hübner, 1937), brachten keine voneinander abweichenden Ergebnisse.

Die Pausen zwischen den einzelnen Versuchen betrugen bei allen Hauptversuchen mindestens fünf Tage, da auf Grund des von H. Vollmer (1940) beschriebenen wellenförmigen Verlaufes pharmakologischer Reaktionen eine längerdauernde Nachwirkung zu erwarten war.

Die Beobachtung, daß die Tagesform der Tiere durch Schwankungen der Temperatur und der Luftfeuchtigkeit stark beeinflußt wird, veranlaßte uns, an allen Versuchstagen stets Kontroll- und Drogenversuche nebeneinander anzusetzen, zumal wir nicht über klimatisierte Versuchsräume verfügten.

Bedeutsam erschien uns die richtige Bemessung der mit Sonde zu verabreichenden Flüssigkeitsmenge, die in der Literatur sowohl pro Tier als auch pro 100 g Tier angegeben wird (siehe H.Vollmer und A.Giebel, 1938, sowie R.Jaretsky und F.Neuwald, 1938). H.Vollmer und A.Giebel (1938) beobachteten, daß nach Zufuhr gleicher Flüssigkeitsmengen pro Tier die nach vier Stunden erhaltenen Urinwerte bei verschiedenen schweren Tieren praktisch gleich sind und sondierten daher 5 ml Flüssigkeit pro Ratte, während R.Jaretsky und F.Neuwald (1938) Gaben von 5 ml Flüssigkeit pro 100 g Ratte für sinnvoll hielten. Im Hauptteil unserer Versuche, auf den sich alle abgebildeten Tabellen und Kurven beziehen, sondierten wir den Tieren - ohne Rücksicht auf ihr genaues Gewicht - 5 ml Flüssigkeit, wobei wir sorgfältig darauf achteten, daß zu Kontroll- und Drogenversuchen etwa gleichschwere Tiere herangezogen wurden. Zu vergleichenden Untersuchungen verabreichten wir - entsprechend den Angaben von R. Jaretsky und F.Neuwald (1938) - 5 ml Flüssigkeit pro 100 g Körpergewicht der Tiere.

Da das Erfassen der meist geringen Harnmengen einen verhältnismäßig großen Fehler erwarten ließ, wurde der ausgeschiedene Harn sowohl durch Ablesen im Meßzylinder als auch darauffolgender Entnahme mit einer graduierten Spritze quantitativ bestimmt, wodurch auch kleine Mengen erfaßt werden konnten. In Vorversuchen wurden diese Messungen alle fünfzehn Minuten während der ersten Stunde sowie alle sechzig Minuten in den folgenden sechs Stunden nach Einsetzen der Tiere in die Diuresekäfige durchgeführt und vierundzwanzig Stunden nach Versuchsbeginn eine abschließende Harnmessung vorgenommen. Dabei beobachteten wir, daß der Schock des Sondierens während der ersten Stunde des Versuchs die Ergebnisse beeinflußt, was sich sowohl in völligem Harnverhalten als auch unverhältnismäßig starker Harnausscheidung der Tiere zeigte, so daß die während der ersten Stunde durch viertelstündliches Ablesen erhaltenen Werte nicht - wie von R.Jaretsky und F.Neuwald (1938) beschrieben - zur Auswertung herangezogen werden sollten. Zudem wurde deutlich, daß der Verlauf einer Diuresebeeinflussung bei der Ratte vorwiegend durch die zwischen erster und siebter Stunde ausgeschiedenen Harne charakterisiert wird, wodurch das von H.Vollmer und K.Hübner (1937) sowie H.Vollmer und A.Giebel (1938) durchgeführte einmalige Ablesen der ausgeschiedenen Harnmenge nach vier Stunden als unzureichend erscheint. Nach Auswertung der Vorversuche entschlossen wir uns daher zu stündlichem Ablesen der ausgeschiedenen Harnmenge während der ersten sieben Stunden des Versuches und zu einer abschließenden Messung nach vierundzwanzig Stunden.

Weitere, vergleichende Untersuchungen wurden nach einer abgewandelten Vorschrift von J.H. Burn (1937), die auch von R. Jaretsky und F. Neuwald (1938) verwendet wurde, durchgeführt.

Der "Kreuztest nach Burn" sieht ebenfalls gleichzeitiges Ansetzen von Kontroll- und Drogenversuchen vor und erstreckt sich über acht Tage. Hierbei wird die eine Hälfte der Tiere am ersten, dritten, fünften und siebten Versuchstag als Kontrolltier-, am zweiten, vierten, sechsten und achten Versuchstag als Drogentiergruppe eingesetzt, während die andere Hälfte der Tiere am ersten, dritten, fünften und siebten Versuchstag als Versuchstier-, am zweiten, vierten, sechsten und achten Versuchstag als Kontrolltiergruppe fungiert.

Um die Ratten nicht unnötigen Belastungen auszusetzen, verzichteten wir auf eine so große Zahl von aufeinanderfolgenden Versuchen und führten in Abwandlung dieser Versuchsanordnung Doppelversuche durch, die sich über drei Tage erstreckten. Hierbei wurde die Kontrolltiergruppe des ersten Versuchstages als Drogentiergruppe des dritten Versuchstages und die Drogentiergruppe des ersten Versuchstages als Kontrolltiergruppe des dritten Versuchstages eingesetzt. Den zweiten Versuchstag bestimmten wir zum Ruhetag, da wir - wie bereits erwähnt - eine längere Auswirkung der gesteigerten Diurese für wahrscheinlich hielten und die Ratten zudem jeweils sieben Stunden während des ersten und dritten Versuchstages nüchtern und ohne Wasser waren. Vom Abend des ersten Versuchstages bis zum Morgen des dritten Versuchstages saßen die Tiere in Makrolon-Käfigen, wo sie ad libitum fressen und saufen konnten. Durch diese Versuchsanordnung war es uns möglich, die Wirkung der Droge an demselben Tier zu beobachten, ohne auf gleichzeitige Kontroll- und Drogenversuche verzichten zu müssen.

3. Auf diuretische Wirksamkeit untersuchte Stoffgruppen

a) Ätherische Öle aus Wurzel und Kraut der Droge

Die auf diuretische Wirksamkeit untersuchten ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut der Droge wurden durch Wasserdampfdestillationen unterschiedlicher Dauer (siehe S.110) gewonnen, wobei für jede Destillationszeit neue Droge frisch angesetzt wurde.

Schwierigkeiten bereitete das Auffinden eines geeigneten Trägers für die perorale Applikation der ätherischen Öle. Da wir die Darreichung in Futterpillen wegen der

unübersichtlichen Freßzeit für ungeeignet hielten, versuchten wir, die ätherischen Öle den Tieren mittels Schlundsonde zu verabreichen. Dazu mußte eine geeignete Flüssigkeit, die die ätherischen Öle quantitativ und dauerhaft zu lösen vermochte und gleichzeitig den tierischen Organismus nicht beeinflusste oder schädigte, gefunden werden. Zu Beginn unserer Versuchsreihen (Versuch 7) lösten wir die Öle in wenig (ca. 10 % der Gesamtflüssigkeitsmenge) Äthanol p. a. und verdünnten bis zur Gesamtflüssigkeitsmenge mit Wasser. Da schon nach wenigen Sekunden die ätherischen Öle wieder abgeschieden wurden, erwies sich diese Lösung als ungeeignet. In den weiteren Versuchen (Versuch 8-9) emulgierten wir die ätherischen Öle in Milch. Dabei erwärmten wir die Öle vorsichtig auf einem Wasserbad und setzten die Milch unter Schütteln und in Anteilen zu. Die so erhaltene Emulsion war zwar stabil, erwies sich jedoch aus pharmakologischer Sicht als problematisch, da einige Tiere mit leichtem Durchfall reagierten. Um eine eventuelle Beeinflussung der Resorption durch Überangebot von Fett aus der Milch-Emulsion zu verhüten, wurde schließlich eine Milch-Wasser-Emulsion derart hergestellt, daß auf einen Teil Milch neun Teile Wasser kamen (ab Versuch 11). Hierbei mußten den auf einem Wasserbad erwärmten ätherischen Ölen die ebenso erwärmten Milch- und Wasseranteile unter Schütteln portionsweise zugesetzt werden.

Um den optimalen Dosierungsbereich abzugrenzen, variierten wir zu Anfang der Versuche die Gaben des ätherischen Öles von 0,0625 - 10,0 mg pro Tier und Versuch. Es wurde deutlich, daß die ätherischen Öle der untersuchten Droge eine prozentual gesteigerte Diurese bewirken, die schon nach Gaben von 0,25 mg pro Tier (Gewicht ca. 100 g) zu beobachten ist und deren Maximum nach Gaben von 0,5 - 1,0 mg pro Tier (Gewicht ca. 100 g) liegt. Höhere Dosen rufen keine entsprechend vermehrte Harnausscheidung hervor.

Dieses Ergebnis konnte durch unsere vergleichenden Untersuchungen mit Gaben von 0,5 mg pro 100 g Ratte sowie mit den nach einer abgewandelten Vorschrift von J. H. Burn (1937) durchgeführten Versuchen bestätigt werden.

In allen weiteren Versuchen betrugen die Gaben 0,5 und 1,0 mg pro Tier (Hauptversuche, auf die sich alle abgebildeten Kurven und Tabellen beziehen) sowie 0,5 mg pro 100 g Tier (vergleichende Untersuchungen).

Die Auswertung zeigte, daß die durch unterschiedliche Destillationsdauer gewonnenen ätherischen Öle der Wurzeldroge diuretisch verschieden stark wirksam sind. Bei den durch kürzere Destillationszeiten hergestellten ätherischen Ölen ist eine größere prozentuale Harnvermehrung als bei den nach längeren Wasserdampfdestillationen abgetrennten ätherischen Ölen zu beobachten. Eine Erklärung hierfür dürfte in der wechselnden quantitativen Zusammensetzung dieser ätherischen Öle (siehe Abb. 15) zu suchen sein. Tabelle 6 soll eine Übersicht der prozentualen Unterschiede zwischen Kontroll- und Drogenversuchen aller untersuchten ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut der Droge geben. Signifikante Werte sind durch * , sehr signifikante Werte durch * gekennzeichnet.

Im folgenden sollen die Ergebnisse der einzelnen Versuchsgruppen (siehe Tab. 7) genauer beschrieben werden :

Das durch sechsstündige Destillationsdauer gewonnene ätherische Wurzelöl ruft nach Gaben von 0,5 und 1,0 mg pro Tier keine signifikante Diuresesteigerung hervor. Die durchschnittliche prozentuale Harnvermehrung beträgt nach Einzelgaben von 0,5 mg dieses ätherischen Öles von der zweiten bis zur siebten Stunde einschließlich 8 % mit dem höchsten Wert von 16 % in der dritten Stunde und nach Einzelgaben von 1,0 mg dieses ätherischen Öles für dieselbe Zeitspanne 13 % mit der größten Steigerung von 22 % in der dritten Stunde.

Gaben des durch vierstündige Destillationsdauer erhaltenen ätherischen Wurzelöles von 1,0 mg pro Tier bewirken eine Diuresesteigerung, die in der vierten ($p = 0,0305$) und vierundzwanzigsten Stunde ($p = 0,0322$) signifikant, in der sechsten ($p = 0,0062$) und siebten Stunde ($p = 0,0063$) sehr signifikant ist. Hier liegt von der zweiten bis zur siebten Stunde einschließlich eine durchschnittliche Harnvermehrung von 30 % mit dem größten prozentualen Anstieg von 35 % in der dritten Stunde vor.

Einzelgaben von 0,5 mg des nach vierstündiger Destillationsdauer abgetrennten ätherischen Wurzelöles rufen dagegen keine signifikante diuretische Wirkung hervor. Die durchschnittliche prozentuale Harnvermehrung von der zweiten bis zur siebten Stunde einschließlich beträgt hier 29 %, wobei die größte Diuresesteigerung mit 47 % in der zweiten Stunde zu beobachten ist.

Tabelle 6: Prozentuale Unterschiede zwischen Kontroll- und Drogenversuchen aller untersuchten ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut der Droge.

Rad. Onon. äther. Öl	n	1. $\frac{h}{h}$	2. $\frac{h}{h}$	3. $\frac{h}{h}$	4. $\frac{h}{h}$	5. $\frac{h}{h}$	6. $\frac{h}{h}$	7. $\frac{h}{h}$	24. $\frac{h}{h}$	Gabe
Dest. dauer 6 $\frac{h}{h}$	35	- 27,0	+ 13,8	+ 16,4	+ 9,0	+ 6,1	+ 1,1	+ 4,0	- 5,4	0,5 mg/T.
Dest. dauer 6 $\frac{h}{h}$	116	+ 12,7	+ 9,4	+ 21,7	+ 16,3	+ 12,7	+ 7,9	+ 8,0	+ 5,3	1,0 mg/T.
Dest. dauer 4 $\frac{h}{h}$	9	—	+ 46,7	+ 36,4	+ 37,0	+ 20,0	+ 18,9	+ 14,0	- 4,8	0,5 mg/T.
Dest. dauer 4 $\frac{h}{h}$	70	+ 17,9	+ 25,0	+ 34,6	+ 31,1*	+ 30,6	+ 30,6**	+ 29,3**	+ 14,6*	1,0 mg/T.
Dest. dauer 2 $\frac{h}{h}$	9	—	+ 46,7	+ 59,1*	+ 51,9*	+ 37,1*	+ 43,2**	+ 30,2*	+ 2,4	0,5 mg/T.
Dest. dauer 2 $\frac{h}{h}$	54	- 11,7	+ 9,8	+ 25,6	+ 16,5	+ 13,4	+ 15,2	+ 11,6	+ 9,2	1,0 mg/T.
Dest. dauer 1 $\frac{h}{h}$	3	—	+ 100,0	+ 25,0	+ 30,0	+ 15,4	+ 15,4	+ 6,7	- 6,7	0,5 mg/T.
Dest. dauer 1 $\frac{h}{h}$	16	+ 31,1	+ 15,2	+ 33,7	+ 22,8	+ 22,0	+ 17,0	+ 29,8	+ 3,8	1,0 mg/T.
Dest. dauer 1/2 $\frac{h}{h}$	6	+ 900,0	+ 183,3	+ 90,0	+ 43,8	+ 30,0	+ 22,7	+ 11,5	± 0	0,5 mg/T.
Dest. dauer 1/2 $\frac{h}{h}$	15	- 6,7	+ 15,6	+ 37,6	+ 23,6	+ 26,0	+ 21,9	+ 30,8	+ 5,6	1,0 mg/T.
Herb. Onon. äther. Öl										
Dest. dauer 6 $\frac{h}{h}$	12	+ 222,2	+ 183,3*	+ 134,6*	+ 122,6*	+ 82,9	+ 75,0	+ 62,5	+ 18,2	0,5 mg/T.
Dest. dauer 6 $\frac{h}{h}$	26	+ 74,3	+ 38,1	+ 30,5	+ 38,6	+ 19,1	+ 20,7	+ 15,5	- 2,2	1,0 mg/T.

n = Anzahl der Drogenversuchstiere,

* = signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Drogenversuchen,

** = sehr signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Drogenversuchen

Das durch zweistündige Destillation gewonnene ätherische Öl aus den Wurzeln der Droge zeigt nach Gaben von 0,5 mg pro Tier eine signifikante diuretische Wirksamkeit in der dritten ($p = 0,0101$), vierten ($p = 0,0488$), fünften ($p = 0,0314$) und siebten Stunde ($p = 0,0101$), eine sehr signifikante Wirkung in der sechsten Stunde ($p = 0,0048$). Insgesamt wurde von der zweiten bis zur siebten Stunde einschließlich eine durchschnittliche Diuresesteigerung von 45 % ermittelt, wobei die größte prozentuale Harnvermehrung mit 59 % in der dritten Stunde liegt.

Einzelgaben von 1,0 mg des durch zweistündige Destillationsdauer erhaltenen ätherischen Wurzelöles bewirken dagegen keine signifikante Diuresesteigerung. Die durchschnittliche prozentuale Harnvermehrung beträgt von der zweiten bis zur siebten Stunde einschließlich 15 % mit der größten Steigerung von 26 % in der dritten Stunde.

Für die durch kürzere Destillationszeiten (eine halbe und eine Stunde) gewonnenen ätherischen Wurzelöle konnten nach Einzelgaben von 1,0 mg keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Drogenversuchen nachgewiesen werden. Wegen der kleinen Zahl an Versuchen wurde für Gaben von 0,5 mg pro Tier dieser ätherischen Öle die Berechnung auf Signifikanz nicht durchgeführt.

Die durchschnittliche prozentuale Diuresesteigerung des nach einstündiger Destillationsdauer abgeschiedenen ätherischen Wurzelöles beläuft sich nach Gaben von 0,5 mg pro Tier auf 32 % mit der stärksten Harnvermehrung von 100 % in der zweiten Stunde und nach Gaben von 1,0 mg pro Tier auf 23 % mit dem höchsten Wert von 34 % in der dritten Stunde.

Das durch halbstündige Destillation gewonnene ätherische Wurzelöl ruft nach Gaben von 0,5 mg pro Tier von der zweiten bis zur siebten Stunde einschließlich eine durchschnittliche Diuresesteigerung von 64 % hervor, wobei in der zweiten Stunde mit 183 % die stärkste durch unser ätherisches Wurzelöl verursachte stündliche Harnvermehrung zu beobachten ist. Gaben dieses ätherischen Öles von 1,0 mg pro Tier zeigen von der zweiten bis zur siebten Stunde einschließlich eine durchschnittliche Diuresesteigerung von 26 % mit dem höchsten Wert von 38 % in der dritten Stunde. Tabelle 7 charakterisiert die Diurese nach Sondieren der ätherischen Öle aus Radix Ononidis von der ersten bis zur siebten und nach der vierundzwanzigsten Stunde des Versuches.

Rad. On. Gabe	Äther. Öl		Dest. dauer 6 h		Dest. dauer 4 h		Äther. Öl		Dest. dauer 2 h		Äther. Öl		Dest. dauer 1 h		Äther. Öl		Dest. dauer 1/2 h	
	Kontr.	Droge	0,5 mg/T.	1,0 mg/T.	Kontr.	Droge	0,5 mg/T.	1,0 mg/T.	Kontr.	Droge	0,5 mg/T.	1,0 mg/T.	Kontr.	Droge	0,5 mg/T.	1,0 mg/T.	Kontr.	Droge
$\bar{x}$	0,441	0,322	0,713	0,804	0,000	0,944	0,906	1,068	0,000	1,389	1,382	1,203	0,000	2,000	1,694	2,222	0,167	1,667
Se	0,583	0,371	0,788	0,715	0,000	0,948	0,888	0,862	0,000	1,058	1,139	1,050	—	—	1,035	1,471	0,236	0,471
Sm	0,141	0,096	0,123	0,105	0,000	0,547	0,181	0,163	0,000	0,611	0,237	0,219	—	—	0,423	0,600	0,167	0,333
n	17	15	41	46	3	3	24	28	3	3	23	23	1	1	6	6	2	4
%	—	-27,0	—	12,7	—	—	—	17,9	—	—	—	-11,7	—	—	—	31,1	—	-6,7
Test	—	M	—	M	—	—	—	t	—	M	—	t	—	—	—	t	—	t
Alpha	—	87,50	—	31,79	—	10,00	—	50,78	—	10,00	—	62,41	—	—	—	48,87	—	82,64
$\bar{x}$	1,206	1,372	1,388	1,518	1,667	2,444	1,384	1,729	1,667	2,444	1,880	2,065	1,667	3,333	2,750	3,167	1,000	2,833
Se	0,966	1,098	1,135	1,086	0,000	0,770	1,034	1,105	0,000	0,385	1,225	1,430	—	—	1,320	1,726	0,943	0,707
Sm	0,234	0,283	0,177	0,160	0,000	0,444	0,211	0,209	0,000	0,222	0,255	0,298	—	—	0,539	0,704	0,667	0,500
n	17	15	41	46	3	3	24	28	3	3	23	23	1	1	6	6	2	4
%	—	13,8	—	9,4	—	46,7	—	25,0	—	—	46,7	—	—	100,0	—	15,2	—	15,6
Test	—	M	—	M	—	—	—	t	—	M	—	t	—	—	—	t	—	t
Alpha	—	71,74	—	58,70	—	10,00	—	25,24	—	10,00	—	64,02	—	—	—	64,86	—	65,05
$\bar{x}$	1,789	2,083	1,857	2,259	2,444	3,333	1,750	2,356	2,444	3,889	2,333	2,931	2,667	3,333	2,806	3,750	1,667	3,167
Se	1,256	1,208	1,409	1,069	0,385	1,202	1,196	1,156	0,385	0,385	1,502	1,708	—	—	1,404	1,822	1,414	0,236
Sm	0,305	0,312	0,220	0,158	0,222	0,694	0,244	0,218	0,222	0,222	0,313	0,356	—	—	0,573	0,744	1,000	0,167
n	17	15	41	46	3	3	24	28	3	3	23	23	1	1	6	6	2	4
%	—	16,4	—	21,7	—	36,4	—	34,6	—	—	59,1	—	—	25,0	—	33,7	—	90,0
Test	—	t	—	t	—	t	—	t	—	—	t	t	—	—	—	t	—	t
Alpha	—	50,62	—	13,47	—	28,96	—	6,97	—	—	1,01	—	—	—	—	33,82	—	—
$\bar{x}$	2,544	2,772	2,497	2,903	3,000	4,111	2,276	2,984	3,000	4,556	3,080	3,587	3,333	4,333	3,778	4,639	2,667	3,833
Se	1,472	1,278	1,531	1,067	0,577	1,644	1,165	1,122	0,577	0,770	1,527	1,671	—	—	1,548	1,347	0,943	0,707
Sm	0,357	0,330	0,239	0,157	0,333	0,949	0,238	0,212	0,333	0,444	0,318	0,348	—	—	0,632	0,550	0,667	0,500
n	17	15	41	46	3	3	24	28	3	3	23	23	1	1	6	6	2	4
%	—	9,0	—	16,3	—	37,0	—	31,1	—	51,9	—	16,5	—	30,0	—	22,8	—	43,8
Test	—	t	—	M	—	t	—	t	—	t	—	t	—	—	—	t	—	—
Alpha	—	64,53	—	14,57	—	33,15	—	3,05	—	4,88	—	28,84	—	—	—	32,83	—	—
$\bar{x}$	2,544	2,772	2,497	2,903	3,000	4,111	2,276	2,984	3,000	4,556	3,080	3,587	3,333	4,333	3,778	4,639	2,667	3,833
Se	1,472	1,278	1,531	1,067	0,577	1,644	1,165	1,122	0,577	0,770	1,527	1,671	—	—	1,548	1,347	0,943	0,707
Sm	0,357	0,330	0,239	0,157	0,333	0,949	0,238	0,212	0,333	0,444	0,318	0,348	—	—	0,632	0,550	0,667	0,500
n	17	15	41	46	3	3	24	28	3	3	23	23	1	1	6	6	2	4
%	—	9,0	—	16,3	—	37,0	—	31,1	—	51,9	—	16,5	—	30,0	—	22,8	—	43,8
Test	—	t	—	M	—	t	—	t	—	t	—	t	—	—	—	t	—	—
Alpha	—	64,53	—	14,57	—	33,15	—	3,05	—	4,88	—	28,84	—	—	—	32,83	—	—
$\bar{x}$	2,544	2,772	2,497	2,903	3,000	4,111	2,276	2,984	3,000	4,556	3,080	3,587	3,333	4,333	3,778	4,639	2,667	3,833
Se	1,472	1,278	1,531	1,067	0,577	1,644	1,165	1,122	0,577	0,770	1,527	1,671	—	—	1,548	1,347	0,943	0,707
Sm	0,357	0,330	0,239	0,157	0,333	0,949	0,238	0,212	0,333	0,444	0,318	0,348	—	—	0,632	0,550	0,667	0,500
n	17	15	41	46	3	3	24	28	3	3	23	23	1	1	6	6	2	4
%	—	9,0	—	16,3	—	37,0	—	31,1	—	51,9	—	16,5	—	30,0	—	22,8	—	43,8
Test	—	t	—	M	—	t	—	t	—	t	—	t	—	—	—	t	—	—
Alpha	—	64,53	—	14,57	—	33,15	—	3,05	—	4,88	—	28,84	—	—	—	32,83	—	—
$\bar{x}$	2,544	2,772	2,497	2,903	3,000	4,111	2,276	2,984	3,000	4,556	3,080	3,587	3,333	4,333	3,778	4,639	2,667	3,833
Se	1,472	1,278	1,531	1,067	0,577	1,644	1,165	1,122	0,577	0,770	1,527	1,671	—	—	1,548	1,347	0,943	0,707
Sm	0,357	0,330	0,239	0,157	0,333	0,949	0,238	0,212	0,333	0,444	0,318	0,348	—	—	0,632	0,550	0,667	0,500
n	17	15	41	46	3	3	24	28	3	3	23	23	1	1	6	6	2	4
%	—	9,0	—	16,3	—	37,0	—	31,1	—	51,9	—	16,5	—	30,0	—	22,8	—	43,8
Test	—	t	—	M	—	t	—	t	—	t	—	t	—	—	—	t	—	—
Alpha	—	64,53	—	14,57	—	33,15	—	3,05	—	4,88	—	28,84	—	—	—	32,83	—	—
$\bar{x}$	2,544	2,772	2,497	2,903	3,000	4,111	2,276	2,984	3,000	4,556	3,080	3,587	3,333	4,333	3,778	4,639	2,667	3,833
Se	1,472	1,278	1,531	1,067	0,577	1,644	1,165	1,122	0,577	0,770	1,527	1,671	—	—	1,548	1,347	0,943	0,707
Sm	0,357	0,330	0,239	0,157	0,333	0,949	0,238	0,212	0,333	0,444	0,318	0,348	—	—	0,632	0,550	0,667	0,500
n	17	15	41	46	3	3	24	28	3	3	23	23	1	1	6	6	2	4
%	—	9,0	—	16,3	—	37,0	—	31,1	—	51,9	—	16,5	—	30,0	—	22,8	—	43,8
Test	—	t	—	M	—	t	—	t	—	t	—	t	—	—	—	t	—	—
Alpha	—	64,53	—	14,57	—	33,15	—	3,05	—	4,88	—	28,84	—	—	—	32,83	—	—
$\bar{x}$	2,544	2,772	2,497	2,903	3,000	4,111	2,276	2,984	3,000	4,556	3,080	3,587	3,333	4,333	3,778	4,639	2,667	3,833
Se	1,472	1,278	1,531	1,067	0,577	1,644	1,165	1,122	0,577	0,770	1,527	1,671	—	—	1,548	1,347	0,943	0,707
Sm	0,357	0,330	0,239	0,157	0,333	0,949	0,238	0,212	0,333	0,444	0,318	0,348	—	—	0,632	0,550	0,667	0,500
n	17	15	41	46	3	3	24	28	3	3	23	23	1	1	6	6	2	4
%	—	9,0	—	16,3	—	37,0	—	31,1	—	51,9	—	16,5	—	30,0	—	22,8	—	43,8
Test	—	t	—	M	—	t	—	t	—	t	—	t	—	—	—	t	—	—
Alpha	—	64,53	—	14,57	—	33,15	—	3,05	—	4,88	—	28,84	—	—	—	32,83	—	—
$\bar{x}$	2,544	2,772	2,497	2,903	3,000	4,111	2,276	2,984	3,000	4,556	3,080	3,587	3,333	4,333	3,778	4,639	2,667	3,833
Se	1,472	1,278	1,531	1,067	0,577	1,644	1,165	1,122	0,577	0,770	1,527	1,671	—	—	1,548	1,347	0,943	0,707
Sm	0,357	0,330	0,239	0,157	0,333	0,949	0,238	0,212	0,333	0,444	0,318	0,348	—	—	0,632	0,550	0,667	0,500
n	17	15	41	46	3	3	24	28	3	3	23	23	1	1	6	6	2	4
%	—	9,0	—	16,3	—	37,0	—	31,1	—	51,9	—	16,5	—	30,0	—	22,8	—	43,8
Test	—	t	—	M	—	t	—	t	—	t	—	t	—	—	—	t	—	—
Alpha	—	64,53	—	14,57	—	33,15	—	3,05	—	4,88	—	28,84	—	—	—	32,83	—	—
$\bar{x}$	2,544	2,772	2,497	2,903	3,000	4,111	2,276	2,984	3,000	4,556	3,080	3,587	3,333	4,333	3,778	4,639	2,667	3,833
Se	1,472	1,278	1,531	1,067	0,577	1,644	1,165	1,122	0,577	0,770	1,527	1,671	—	—	1,548	1,347	0,943	0,707
Sm	0,357	0,330	0,239	0,157	0,333	0,949	0,238	0,212	0,333	0,444	0,318	0,348	—	—	0,632	0,550	0,667	0,500
n	17	15	41	46	3	3	24	28	3	3	23	23	1	1	6	6	2	4
%	—	9,0	—	16,3	—	37,0	—	31,1	—	51,9	—	16,5	—	30,0	—	22,8	—	43,8
Test	—	t	—	M	—	t	—	t	—	t	—	t	—					

Rad. On.	äther. Öl	Dest. dauer 6 h	äther. Öl	Dest. dauer 4 h	äther. Öl	Dest. dauer 2 h	äther. Öl	Dest. dauer 1 h	äther. Öl	Dest. Dauer 1/2 h	Vers. dauer									
Gabe	0,5 mg/T.	1,0 mg/T.	0,5 mg/T.	1,0 mg/T.	0,5 mg/T.	1,0 mg/T.	0,5 mg/T.	1,0 mg/T.	0,5 mg/T.	1,0 mg/T.	1,0 mg/T.									
	Kontr.	Droge	Kontr.	Droge	Kontr.	Droge	Kontr.	Droge	Kontr.	Droge	Kontr.									
$\bar{x}$	3,206	3,400	3,142	3,540	3,889	4,667	2,767	3,615	3,889	5,333	3,630	4,116	4,333	5,000	4,167	5,083	3,333	3,042	3,833	
Se	1,630	1,410	1,556	1,201	0,509	1,155	1,388	1,190	0,509	0,577	1,595	1,817	—	—	1,606	1,242	1,414	0,943	1,066	0,782
Sm	0,395	0,364	0,243	0,177	0,294	0,667	0,283	0,225	0,294	0,333	0,333	0,379	—	—	0,655	0,507	1,000	0,667	0,533	0,350
n	17	15	41	46	3	3	24	28	3	3	23	23	1	1	6	6	2	2	4	5
%	—	6,1	—	12,7	—	20,0	—	30,6	—	37,1	—	13,4	—	15,4	—	22,0	—	30,0	—	26,0
Test	t	—	t	—	t	—	M	—	t	—	—	M	—	—	t	—	—	—	—	t
Alpha	—	72,30	—	18,33	—	34,60	—	8,20	—	3,14	—	42,10	—	—	—	29,45	—	—	—	23,79
$\bar{x}$	3,725	3,767	3,620	3,906	4,111	4,889	3,080	4,022	4,111	5,889	4,087	4,710	4,333	5,000	4,750	5,556	3,667	4,500	3,583	4,367
Se	1,406	1,447	1,495	1,341	0,192	1,262	1,335	1,039	0,192	0,509	1,699	1,916	—	—	1,612	1,365	0,943	0,707	0,967	0,767
Sm	0,341	0,374	0,233	0,198	0,111	0,729	0,273	0,196	0,111	0,294	0,354	0,399	—	—	0,658	0,557	0,667	0,500	0,484	0,343
n	17	15	41	46	3	3	24	28	3	3	23	23	1	1	6	6	2	2	4	5
%	—	1,1	—	7,9	—	18,9	—	30,6	—	43,2	—	15,2	—	15,4	—	17,0	—	22,7	—	21,9
Test	M	—	t	—	t	—	t	—	t	—	t	—	—	—	t	—	—	—	—	t
Alpha	—	65,96	—	34,96	—	35,09	—	0,62	—	0,48	—	24,94	—	—	—	37,22	—	—	—	21,60
$\bar{x}$	4,059	4,222	3,896	4,209	4,778	5,444	3,384	4,376	4,778	6,222	4,572	5,101	5,000	5,333	4,944	6,417	4,333	4,833	3,875	5,067
Se	1,605	1,658	1,566	1,392	0,192	0,770	1,358	1,153	0,192	0,509	1,841	1,865	—	—	1,389	1,497	0,943	0,707	0,832	1,004
Sm	0,389	0,428	0,245	0,205	0,111	0,444	0,277	0,218	0,111	0,294	0,364	0,389	—	—	0,567	0,611	0,667	0,500	0,416	0,449
n	17	15	41	46	3	3	24	28	3	3	23	23	1	1	6	6	2	2	4	5
%	—	4,0	—	8,0	—	14,0	—	29,3	—	30,2	—	11,6	—	6,7	—	29,8	—	11,5	—	30,8
Test	t	—	t	—	t	—	t	—	t	—	t	—	—	—	—	t	—	—	—	t
Alpha	—	77,91	—	32,65	—	21,94	—	0,63	—	1,01	—	33,83	—	—	—	10,79	—	—	—	9,90
$\bar{x}$	8,882	8,400	8,306	8,747	9,222	8,778	8,385	9,608	9,222	9,444	9,533	10,408	10,000	9,333	9,472	9,833	8,667	8,667	8,458	8,933
Se	3,460	2,809	2,919	2,379	1,072	1,644	2,025	1,679	1,072	0,839	2,756	2,108	—	—	0,957	1,169	1,886	0,943	1,228	1,657
Sm	0,839	0,725	0,487	0,369	0,619	0,949	0,442	0,343	0,619	0,454	0,616	0,471	—	—	0,391	0,477	1,333	0,667	0,614	0,741
n	17	15	36	36	3	3	21	24	3	3	20	20	1	1	6	6	2	2	4	5
%	—	-5,4	—	5,3	—	-4,8	—	14,6	—	2,4	—	9,2	—	-6,7	—	3,8	—	0,0	—	5,6
Test	t	—	t	—	t	—	t	—	t	—	t	—	—	—	—	t	—	—	—	t
Alpha	—	67,09	—	48,46	—	71,51	—	3,22	—	79,16	—	26,65	—	—	—	57,12	—	—	—	64,86

($\bar{x}$ = Mittelwert, Se = Standardabweichung des Mittelwertes, Sm = Fehler des Mittelwertes, n = Anzahl der Meßwerte, % = prozentualer Unterschied zwischen Kontroll- und Drogenversuchen, Test = durchgeführter Test = t-Test nach Student [t] bzw. Mann-Whitney-Test [M], Alpha = Irrtumswahrscheinlichkeit)

Der t-Test nach Student und der Mann-Whitney-Test (siehe S. 134) konnte aus Mangel an Einzelversuchen nicht bei allen Versuchsgruppen durchgeführt werden. Bei den so ausgewerteten Versuchen wurde deutlich, daß eine signifikante diuretische Wirksamkeit sowohl von der durch die Destillationsdauer bestimmten Zusammensetzung als auch von der Einzelgabe des ätherischen Öles abhängig ist. Die Tatsache, daß ausschließlich Einzelgaben von 0,5 mg des durch zweistündige Destillation sowie 1,0 mg des durch vierstündige Destillation gewonnenen ätherischen Wurzelöles eine signifikante diuretische Wirksamkeit zeigen, läßt vermuten, daß nur hier ein ausgewogenes Zusammenspiel von Einzelgaben und Zusammensetzung vorliegt. Einzelgaben von 1,0 mg des nach zweistündiger Destillation abgeschiedenen ätherischen Wurzelöles, die nicht signifikant diuretisch wirksam sind, lassen eine Überdosierung vermuten, während 0,5 mg des durch vierstündige Destillation hergestellten ätherischen Wurzelöles auf Grund der ebenfalls nicht signifikanten Wirksamkeit als unterdosiert gedeutet werden können. Eine Erklärung hierfür dürfte sein, daß bei längerer Destillationsdauer diuretisch weniger wirksame (u.a. freie Fettsäuren) oder unwirksame Stoffe in die ätherischen Öle übergehen.

Die Abbildungen 35 - 44 geben den Verlauf der Diurese nach Sondieren der ätherischen Öle von Radix Ononidis wieder.

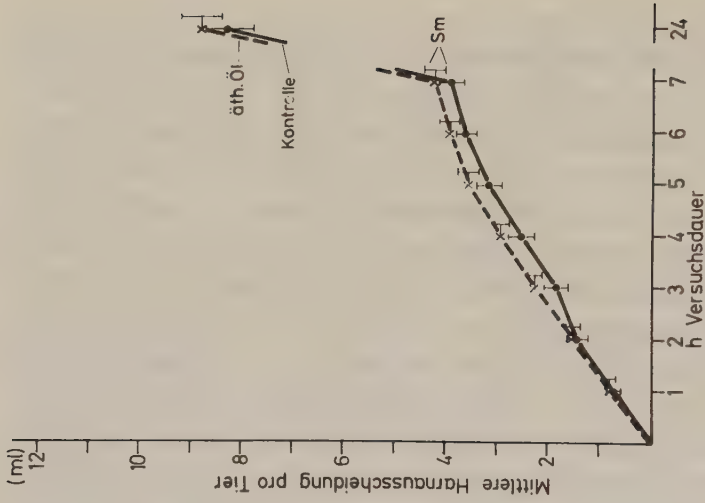


Abb. 36: Diurese nach Sondieren des durch sechsstündige Destillation gewonnenen ätherischen Öles von Radix Ononidis, Gabe 1,0 mg pro Tier.

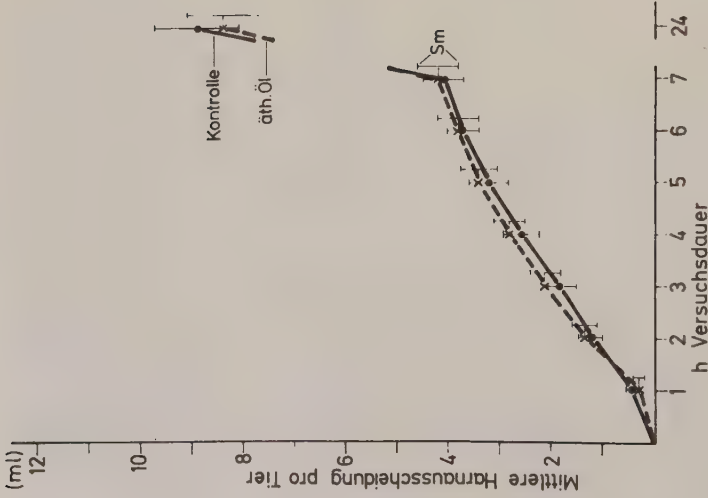


Abb. 35: Diurese nach Sondieren des durch sechsstündige Destillation gewonnenen ätherischen Öles von Radix Ononidis, Gabe 0,5 mg pro Tier.

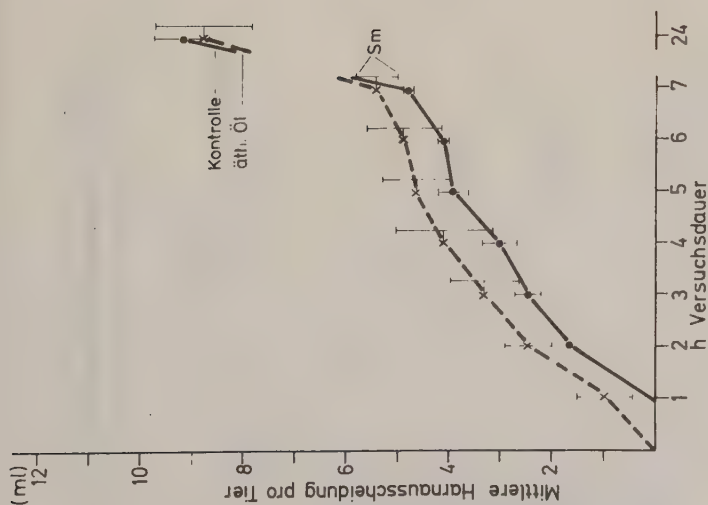


Abb. 37: Diurese nach Sondieren des durch vierstündige Destillation gewonnenen ätherischen Öles von Radix Ononidis, Gabe 0,5 mg pro Tier.

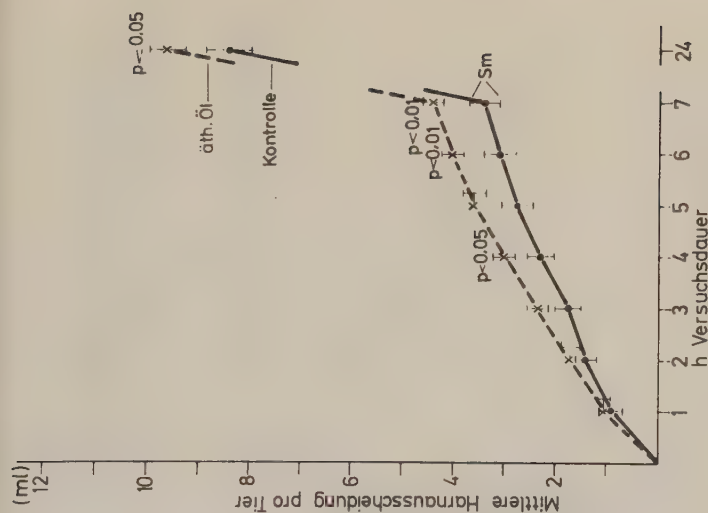


Abb. 38: Diurese nach Sondieren des durch vierstündige Destillation gewonnenen ätherischen Öles von Radix Ononidis, Gabe 1,0 mg pro Tier.

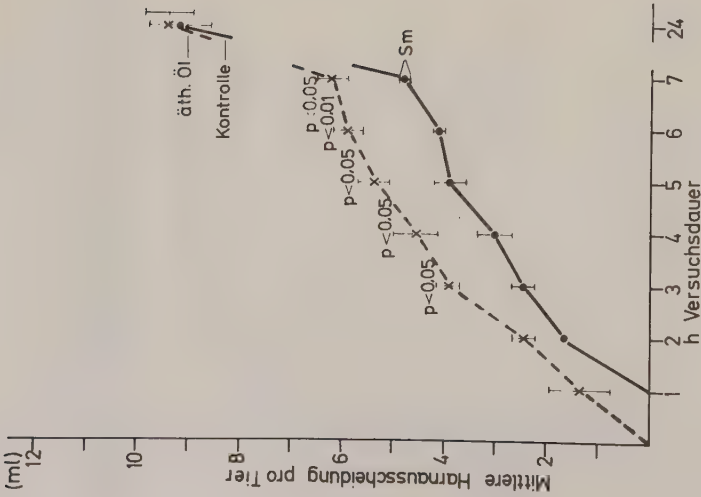


Abb. 39: Diurese nach Sondieren des durch zweistündige Destillation gewonnenen ätherischen Öles von Radix Ononidis, Gabe 0,5 mg pro Tier.

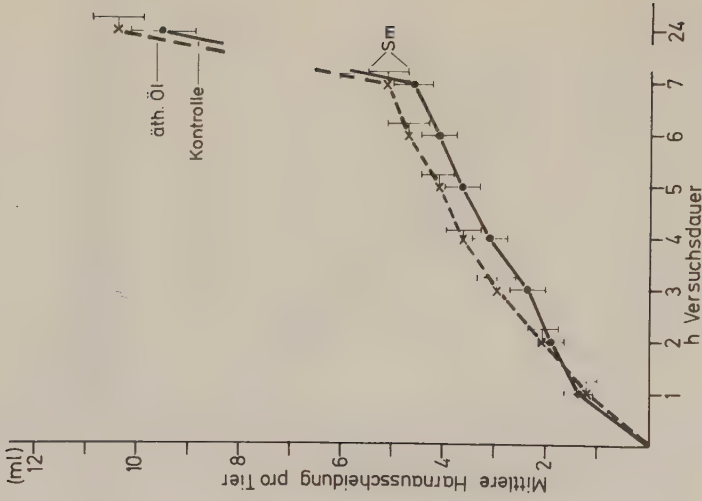


Abb. 40: Diurese nach Sondieren des durch zweistündige Destillation gewonnenen ätherischen Öles von Radix Ononidis, Gabe 1,0 mg pro Tier.

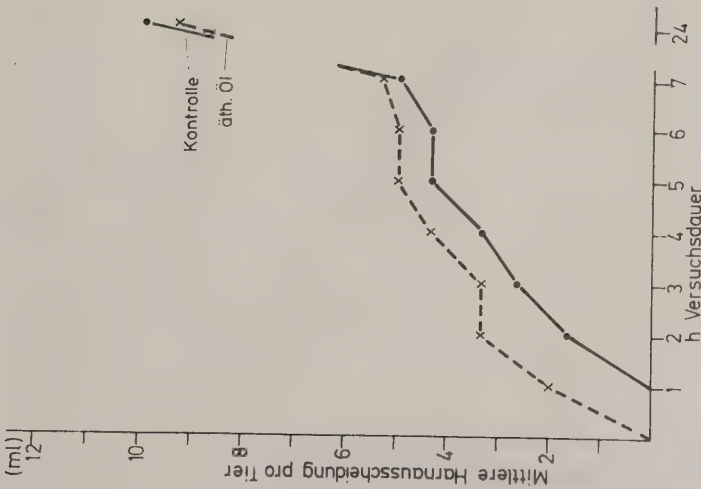


Abb. 41: Diurese nach Sondieren des durch einstündige Destillation gewonnenen ätherischen Öles von Radix Ononidis, Gabe 0,5 mg pro Tier.

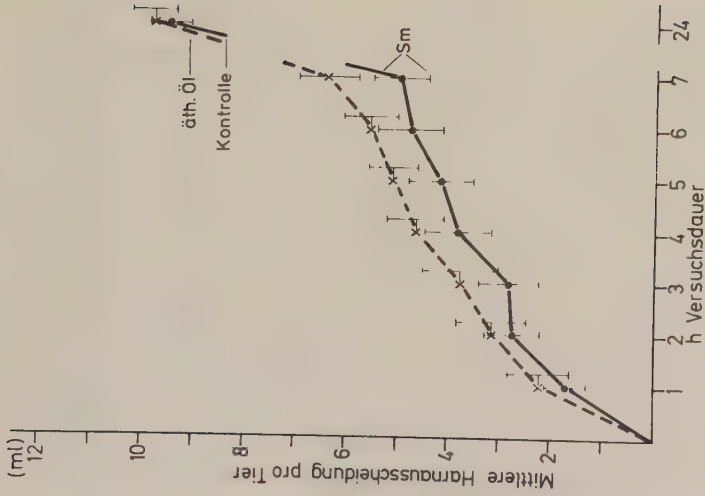


Abb. 42: Diurese nach Sondieren des durch einstündige Destillation gewonnenen ätherischen Öles von Radix Ononidis, Gabe 1,0 mg pro Tier.

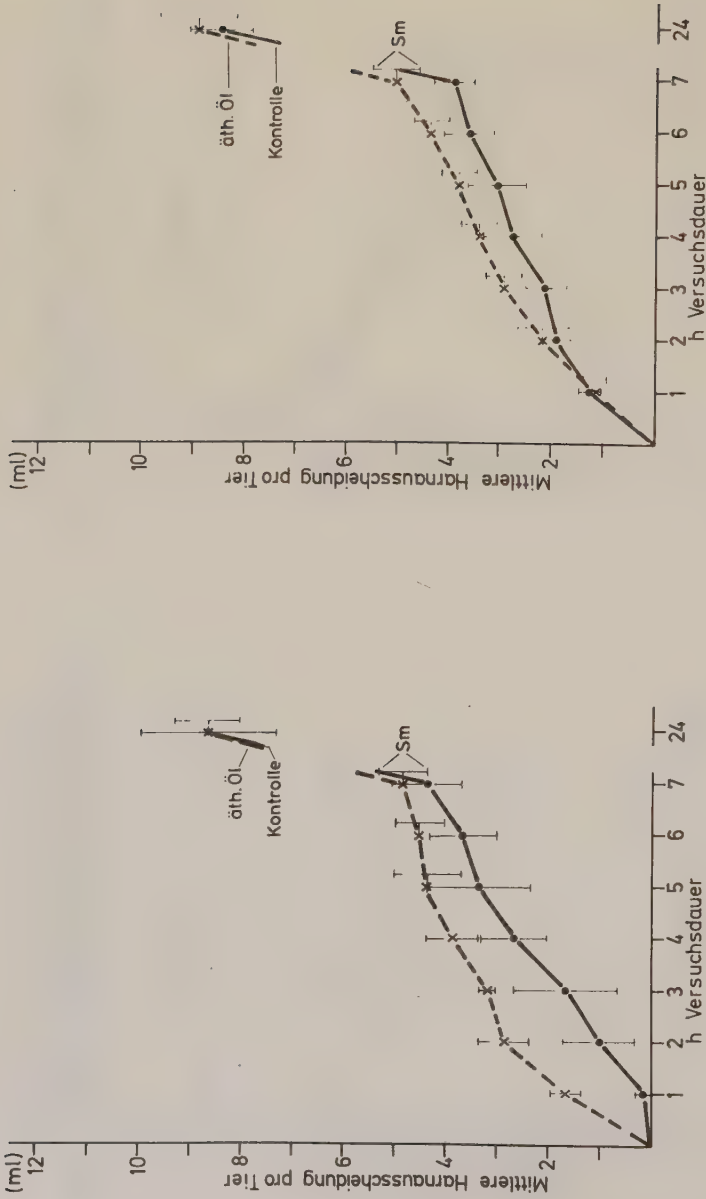


Abb. 43: Diuresis nach Sondieren des durch halbstündige Destillation gewonnenen ätherischen Öles von Radix Ononidis, Gabe 0,5 mg pro Tier.

Abb. 44: Diuresis nach Sondieren des durch halbstündige Destillation gewonnenen ätherischen Öles von Radix Ononidis, Gabe 1,0 mg pro Tier.

Das ätherische Öl aus dem Kraut der dornigen Hauhechel ruft bei der Ratte ebenfalls eine vermehrte Harnausscheidung hervor (siehe Tab.8).

Das durch sechsstündige Destillation gewonnene ätherische Krautöl zeigt nach Gaben von 0,5 mg pro Tier eine signifikante diuretische Wirkung in der zweiten ($p = 0,0256$), dritten ($p = 0,0248$) und vierten Stunde ($p = 0,0222$), während Gaben von 1,0 mg pro Tier nicht zu signifikanten Unterschieden zwischen Kontroll- und Drogentieren führen. Auch in diesem Falle dürfte es sich bei der Gabe von 1,0 mg pro Tier um eine Überdosierung handeln. Bemerkenswert erscheint, daß Einzelgaben von 0,5 mg dieses ätherischen Öles die größte prozentuale Diuresesteigerung aller von uns untersuchten ätherischen Hauhechelöle verursachen. Von der zweiten bis zur siebten Stunde einschließlich ist hier eine durchschnittliche prozentuale Diuresesteigerung von 110 % zu verzeichnen, wobei der höchste Wert mit 183 % in der zweiten Stunde liegt. Gaben von 1,0 mg des ätherischen Krautöles zeigen jedoch für dieselbe Zeitspanne nur eine durchschnittliche prozentuale Harnvermehrung von 27 % mit dem höchsten Wert von 39 % in der vierten Stunde.

Abb.45 und 46 geben den Verlauf der Diurese nach Sondieren des ätherischen Öles von Herba Ononidis wieder.

Tabelle 8: Diurese nach Sondieren des ätherischen Öles von Herba Ononidis von der ersten bis zur siebten und nach der vierundzwanzigsten Stunde des Versuchs

	Kontr.	Droge 0,5 mg	Kontr.	Droge 1,0 mg		Kontr.	Droge 0,5 mg	Kontr.	Droge 1,0 mg	
$\bar{x}$	0,563	1,813	0,875	1,525	1. $\frac{h}{h}$	2,563	4,688	3,492	4,158	5.
Se	0,515	0,944	0,860	0,895		1,329	1,650	1,475	0,813	
Sm	0,258	0,472	0,272	0,284		0,664	0,825	0,467	0,257	
n	4	4	10	10		4	4	10	10	
%	—	222,2	—	74,3		—	82,9	—	19,1	
Test	—	t	—	t		—	t	—	t	
Alpha	—	5,90	—	11,54		—	9,17	—	22,68	
$\bar{x}$	1,125	3,188	1,683	2,325	2. $\frac{h}{h}$	2,750	4,813	4,017	4,850	6.
Se	0,750	1,179	1,140	0,870		1,173	1,841	1,658	1,254	
Sm	0,375	0,590	0,360	0,275		0,586	0,921	0,524	0,397	
n	4	4	10	10		4	4	10	10	
%	—	183,3	—	38,1		—	75,0	—	20,7	
Test	—	t	—	t		—	t	—	t	
Alpha	—	2,56	—	17,41		—	10,77	—	22,10	
$\bar{x}$	1,625	3,813	2,433	3,175	3. $\frac{h}{h}$	3,000	4,875	4,350	5,025	7.
Se	0,924	1,143	1,798	0,866		1,061	1,809	1,794	1,283	
Sm	0,462	0,572	0,569	0,274		0,530	0,904	0,567	0,406	
n	4	4	10	10		4	4	10	10	
%	—	134,6	—	30,5		—	62,5	—	15,5	
Test	—	t	—	t		—	t	—	t	
Alpha	—	2,48	—	25,53		—	12,39	—	34,59	
$\bar{x}$	1,938	4,313	2,742	3,800	4. $\frac{h}{h}$	6,875	8,125	8,354	8,167	24.
Se	0,966	1,214	1,782	0,729		1,652	2,562	1,928	1,199	
Sm	0,483	0,607	0,564	0,230		0,826	1,281	0,682	0,424	
n	4	4	10	10		4	4	8	8	
%	—	122,6	—	38,6		—	18,2	—	-2,2	
Test	—	t	—	t		—	t	—	t	
Alpha	—	2,22	—	11,62		—	44,35	—	81,87	

($\bar{x}$ = Mittelwert, Se = Standardabweichung des Mittelwertes, Sm = Fehler des Mittelwertes, n = Anzahl der Meßwerte, % = prozentualer Unterschied zwischen Kontroll- u. Drogenversuchen, Test = durchgeführter Test = t-Test nach Student [t] bzw. Mann-Whitney-Test [M], Alpha = Irrtumswahrscheinlichkeit)

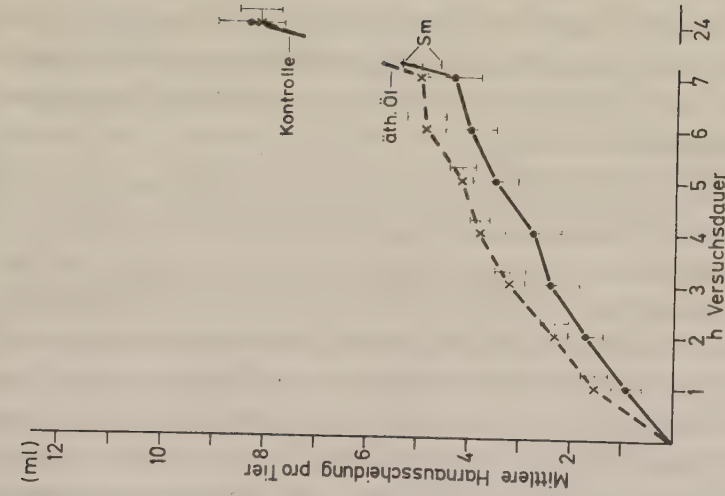


Abb. 46: Diurese nach Sondieren des durch sechsstündige Destillation gewonnenen ätherischen Öles von Herba Ononidis, Gabe 1,0 mg pro Tier.

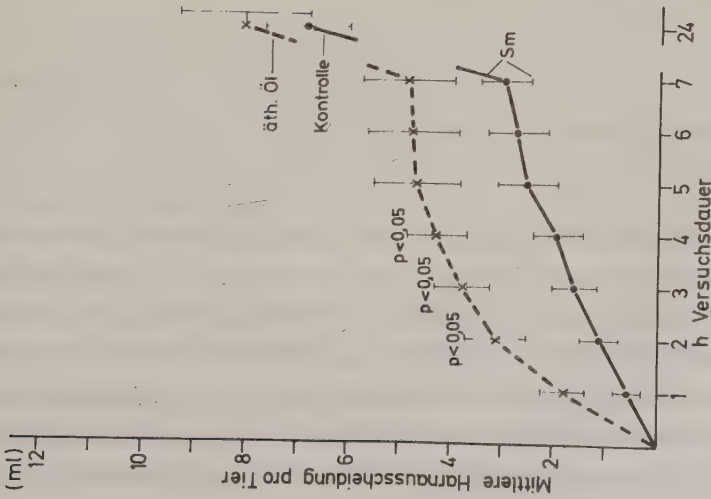


Abb. 45: Diurese nach Sondieren des durch sechsstündige Destillation gewonnenen ätherischen Öles von Herba Ononidis, Gabe 0,5 mg pro Tier.

b) Fractionen der ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut der Droge

Nachdem wir nachgewiesen hatten, daß die ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut der Droge unter bestimmten Voraussetzungen eine signifikante diuretische Wirksamkeit besitzen, versuchten wir aufzuklären, ob eine bestimmte Fraktion der ätherischen Öle für diese Wirksamkeit verantwortlich ist.

So wurden in orientierenden Versuchen die vom ätherischen Wurzelöl abgetrennten Fraktionen der Fettsäuren, Kohlenwasserstoffe, Carbonylverbindungen und Alkohole (siehe S. 114) sowie das verbleibende ätherische Restöl an der Ratte auf diuretische Wirksamkeit geprüft. Zu diesen Versuchen verwendeten wir das durch vierstündige Destillationsdauer gewonnene ätherische Wurzelöl, nachdem für eine bestimmte Gabe dieses ätherischen Öles (1,0 mg pro Tier) eine signifikante diuretische Wirksamkeit nachgewiesen werden konnte. Die Dosierung der einzelnen Fraktionen sowie des nach Abtrennen dieser Fraktionen verbleibenden ätherischen Restöles erforderte wegen der bei den Versuchen mit ätherischen Gesamtölen gezeigten Abhängigkeit der Versuchsergebnisse von bestimmten Einzelgaben größte Sorgfalt. Daher wurden die Gaben entsprechend dem durch quantitative Bestimmung ermittelten Anteil der einzelnen Fraktionen und des Restöles am ätherischen Gesamtöl (siehe S. 20) bemessen und auf Gaben von 1,0 mg pro Tier des durch vierstündige Destillation gewonnenen ätherischen Wurzelöles bezogen.

Diese Versuche brachten keine eindeutigen Ergebnisse, so daß wir uns in allen weiteren Versuchen auf eine Fraktionierung in Fettsäuren, Kohlenwasserstoffe und ätherisches Restöl beschränkten. Die Einzelgaben entsprachen wiederum dem durch quantitative Bestimmung ermittelten Anteil der einzelnen Fraktionen und des Restöles am ätherischen Gesamtöl (siehe S. 20) und wurden bei dem durch sechsstündige Destillation gewonnenen ätherischen Krautöl auf Gaben von 0,5 mg pro Tier und bei dem durch vierstündige Destillation gewonnenen ätherischen Wurzelöl auf Gaben von 1,0 mg pro Tier sowie - bei Verwendung von schwereren Tieren - 0,5 mg pro 100 g Ratte bezogen. In einigen Versuchen sondierten wir zudem von diesen so errechneten Dosen bestimmte Bruchteile und Vielfache. Die Auswertung dieser Versuchsgruppen ergab, daß beide Fraktionen sowie das nach Abtrennen dieser Fraktionen verbleibende ätherische Restöl eine prozentual vermehrte Harnausscheidung bewirken, die der durch das entsprechende ätherische Gesamtöl hervorgerufenen Diuresesteigerung annähernd entspricht bzw. nur geringfügig schwächer

ist und auch durch Variieren der Einzelgaben nicht entscheidend beeinflusst werden kann. Da nach Durchführung verschiedener Reinigungsprozesse eine Verfälschung durch unvollständige oder unsaubere Trennung der gewonnenen Fraktionen und des ätherischen Restöles ausgeschlossen werden konnte, kamen wir zu dem Ergebnis, daß für die diuretische Wirksamkeit der Droge keine einzelne Fraktion oder Verbindung, sondern mehrere, in verschiedenen Fraktionen und im ätherischen Restöl lokalisierte Substanzen bzw. das ätherische Gesamtöl verantwortlich sein müssen.

c) Infuse und Dekokte aus Wurzel und Kraut der Droge

Da die medizinische Anwendung der dornigen Hauhechel auch heute noch in Form wäßriger Abkochungen erfolgt (ÖAB 9), die diuretische Wirksamkeit ihrer Infuse und Dekokte in der Literatur (siehe S. 60) jedoch umstritten ist, hielten wir es für unumgänglich, diese Zubereitungen der Droge im Tierversuch erneut kritisch zu prüfen und die Ergebnisse durch moderne statistische Methoden abzusichern. Um unsere Ergebnisse mit den Angaben in der Literatur vergleichen zu können, bereiteten wir Infuse und Dekokte für unsere Hauptversuche, auf die sich alle abgebildeten Tabellen und Kurven beziehen, ausschließlich nach Vorschrift des DAB 6 zu. Zu vergleichenden Untersuchungen wurden Infuse und Dekokte nach Vorschrift des DAB 7 hergestellt. In der Literatur wird beschrieben, daß Infuse und Dekokte verschiedener Konzentration eine unterschiedliche, teilweise sogar gegensätzliche Wirkung besitzen (siehe S. 60). Daher beschränkten wir uns bei der Zubereitung von Infusen und Dekokten aus Wurzeldroge nicht auf das im DAB 6 angegebene Verhältnis von einem Teil Droge auf zehn Teile Wasser, sondern stellten von diesem Ansatz verschiedene Verdünnungen her. Außerdem wurden Infuse und Dekokte analog der Vorschrift des DAB 6 jedoch in stärkerer Konzentration zubereitet.

Die Auswertung der Versuche ergab (siehe Tab.9), daß weder Infuse noch Dekokte aus Wurzel und Kraut der Droge signifikant von den dazugehörigen Kontrollen zu unterscheiden sind. Die prozentualen Werte zeigten, daß es sich hier - mit Ausnahme bei den Infusen der untersuchten Wurzeldroge - um eine verminderte Harnausscheidung handelt.

So bewirkt der Infus der Wurzeldroge von der zweiten bis zur siebten Stunde einschließlich eine durchschnittliche prozentuale Harnvermehrung von 12 % mit dem größten Wert von 21 % in der dritten Stunde, während der Dekokt der Wurzeldroge in derselben

Zeitspanne eine Harnverminderung von 7 % mit dem größten negativen Wert von 20 % in der zweiten Stunde aufweist.

Der Infus der Krautdroge zeigt von der zweiten bis zur siebten Stunde einschließlich eine durchschnittliche prozentuale Harnverminderung von 2 %, wobei in der zweiten, dritten und vierten Stunde negative Werte, in der fünften, sechsten und siebten Stunde positive Werte zu beobachten sind. Der Dekokt der Krautdroge ruft von der zweiten bis zur siebten Stunde einschließlich eine durchschnittliche prozentuale Harnverminderung von 5 % mit dem größten negativen Wert von 15 % in der dritten Stunde und einem positiven Wert von 2 % in der fünften Stunde hervor.

Die nach Vorschrift des DAB 7 zubereiteten Infuse und Dekokte sowie die verschiedenen Verdünnungen der nach DAB 6 hergestellten Infuse und Dekokte brachten im wesentlichen keine abweichenden Ergebnisse und sollen deshalb nicht weiter diskutiert werden. Bemerkenswert erscheint jedoch, daß Dekokte größerer Verdünnungen gegenüber Dekokten kleinerer Verdünnungen eine stärkere prozentuale Diuresehemmung bewirken. Die analog der Vorschrift des DAB 6, jedoch in stärkerer Konzentration zubereiteten Infuse und Dekokte zeigten keine größere Steigerung oder Hemmung der Harnausscheidung.

Durch kurzes Erhitzen (siehe Zubereitung von Infusen nach DAB 6) der harten Wurzel- droge wird offenbar nur ein Teil der diuretisch wirksamen ätherischen Öle aus der Droge und ihrem Infus entfernt. Die verbleibenden Reste an ätherischem Öl werden wirksam und rufen die schwache Diuresesteigerung hervor. Bei der weichen Krautdroge genügt offensichtlich schon ein kurzes Erhitzen, um das gesamte ätherische Öl aus der Droge und ihrem Infus zu vertreiben. Eine diuresehemmende Komponente der Droge kommt hier wahrscheinlich zum Tragen, so daß insgesamt keine Steigerung, sondern nur eine leichte prozentuale Verminderung der Harnausscheidung nachgewiesen werden kann.

Längeres Erhitzen (siehe Zubereitung von Dekokten nach DAB 6) entfernt offenbar sowohl aus der Krautdroge als auch aus der Wurzeldroge und ihren Dekokten das gesamte ätherische Öl, wodurch die leichte prozentuale Diuresehemmung zu beobachten ist.

Weitere Versuche müssen abklären, ob der bereits von R. Jaretsky und F. Neuwald (1938) vermutete wasserlösliche Stoff für die diuresehemmende Wirkung von Infusen und Dekokt

der Droge verantwortlich ist. Deutlich wurde, daß die ätherischen Öle als diuretisch wirksame Bestandteile der Droge angesprochen werden können, so daß weder Infuse noch Dekokte geeignete Zubereitungsformen darstellen.

Die Abbildungen 47 bis 50 zeigen den Verlauf der Diurese nach Sondieren der Infuse und Dekokte aus Wurzel und Kraut der dornigen Hauhechel von der ersten bis zur siebten Stunde und nach der vierundzwanzigsten Stunde des Versuches.

Tabelle 9: Diurese nach Sondieren von Infusen und Dekokten aus Wurzel und Kraut der dornigen Hauhechel von der ersten bis zur siebten und nach der vierundzwanzigsten Stunde des Versuches.

	Inf. Rad. Onon. 5 ml/Tier		Inf. Herb. Onon. 5 ml/Tier		Dek. Rad. Onon. 5 ml/Tier		Dek. Herb. Onon. 5 ml/Tier		
	Kontr.	Droge	Kontr.	Droge	Kontr.	Droge	Kontr.	Droge	
$\bar{x}$	1,607	1,181	2,200	1,900	2,440	2,089	2,200	1,683	1. ^h
Se	0,888	0,996	0,837	0,962	0,957	0,954	0,837	1,021	
Sm	0,336	0,352	0,374	0,430	0,362	0,389	0,374	0,457	
n	7	8	5	5	7	6	5	5	
%	—	-26,5	—	-13,6	—	-14,4	—	-23,5	
Test	—	t	—	t	—	t	—	t	
Alpha	—	40,09	—	61,30	—	52,19	—	40,70	
$\bar{x}$	1,929	2,188	2,850	2,467	3,560	2,864	2,850	2,483	2. ^h
Se	0,800	1,092	0,962	0,650	0,675	1,331	0,962	1,331	
Sm	0,302	0,386	0,430	0,291	0,255	0,544	0,430	0,595	
n	7	8	5	5	7	6	5	5	
%	—	13,4	—	-13,5	—	-19,5	—	-12,9	
Test	—	t	—	t	—	t	—	t	
Alpha	—	61,40	—	48,13	—	24,88	—	63,11	
$\bar{x}$	2,714	3,281	3,350	2,833	3,788	3,419	3,350	2,850	3. ^h
Se	0,895	0,968	0,894	0,543	0,428	0,825	0,894	1,387	
Sm	0,338	0,342	0,400	0,243	0,162	0,337	0,400	0,620	
n	7	8	5	5	7	6	5	5	
%	—	20,9	—	-15,4	—	-9,7	—	-14,9	
Test	—	t	—	t	—	t	—	t	
Alpha	—	26,22	—	30,17	—	32,24	—	51,73	
$\bar{x}$	3,821	3,906	3,700	3,517	4,462	4,200	3,700	3,567	4. ^h
Se	1,599	1,463	1,037	0,641	0,746	1,165	1,037	1,562	
Sm	0,604	0,517	0,464	0,274	0,282	0,476	0,464	0,698	
n	7	8	5	5	7	6	5	5	
%	—	2,2	—	-5,0	—	-5,9	—	-3,6	
Test	—	t	—	t	—	t	—	t	
Alpha	—	91,62	—	74,24	—	63,34	—	87,76	

	Inf. Rad. Onon. 5 ml/Tier		Inf. Herb. Onon. 5 ml/Tier		Dek. Rad. Onon. 5 ml/Tier		Dek. Herb. Onon. 5 ml/Tier		
	Kontr.	Droge	Kontr.	Droge	Kontr.	Droge	Kontr.	Droge	
$\bar{x}$	3,893	4,188	3,800	4,100	4,786	4,656	3,800	3,867	5. $\frac{h}{-}$
Se	1,513	1,493	1,204	0,802	0,649	1,319	1,204	1,861	
Sm	0,572	0,528	0,539	0,359	0,245	0,538	0,539	0,832	
n	7	8	5	5	7	6	5	5	
%	—	7,6	—	7,9	—	-2,7	—	1,8	
Test	—	t	—	t	—	t	—	t	
Alpha	—	71,08	—	65,53	—	82,11	—	94,80	
$\bar{x}$	3,929	4,531	4,050	4,450	5,105	5,117	4,050	4,050	6. $\frac{h}{-}$
Se	1,463	1,442	1,304	0,758	0,606	0,939	1,304	1,857	
Sm	0,553	0,510	0,583	0,339	0,229	0,383	0,583	0,831	
n	7	8	5	5	7	6	5	5	
%	—	15,3	—	9,9	—	0,2	—	0,0	
Test	—	t	—	t	—	t	—	t	
Alpha	—	43,69	—	56,96	—	97,85	—	100,00	
$\bar{x}$	4,083	4,542	4,633	4,733	5,688	5,556	4,633	4,483	7. $\frac{h}{-}$
Se	1,594	1,298	1,401	0,723	0,791	1,089	1,401	1,826	
Sm	0,651	0,530	0,627	0,323	0,299	0,444	0,627	0,817	
n	6	6	5	5	7	6	5	5	
%	—	11,2	—	2,2	—	-2,3	—	-3,2	
Test	—	t	—	t	—	t	—	t	
Alpha	—	59,70	—	89,07	—	80,42	—	88,77	
$\bar{x}$	6,292	7,292	7,633	8,700	9,807	9,819	7,633	8,100	24. $\frac{h}{-}$
Se	1,926	0,928	1,529	0,975	1,544	1,926	1,529	2,247	
Sm	0,786	0,379	0,684	0,436	0,584	0,786	0,684	1,005	
n	6	6	5	5	7	6	5	5	
%	—	15,9	—	14,0	—	0,1	—	6,1	
Test	—	t	—	t	—	t	—	t	
Alpha	—	27,86	—	22,49	—	99,00	—	71,11	

= Mittelwert, Se = Standardabweichung des Mittelwertes, Sm = Fehler des Mittelwertes,
 = Anzahl der Meßwerte, % = prozentualer Unterschied zwischen Kontroll- u. Drogen-
 versuchen, Test = durchgeführter Test = t-Test nach Student [t] bzw. Mann-Whitney-
 st [M], Alpha = Irrtumswahrscheinlichkeit)

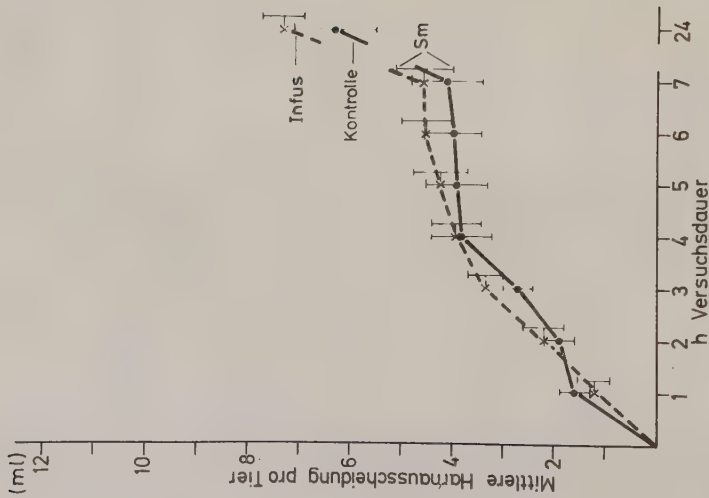


Abb. 47: Diurese nach Sondieren des Infuses (DAB 6) von Radix Ononidis, Gabe 5 ml/Tier.

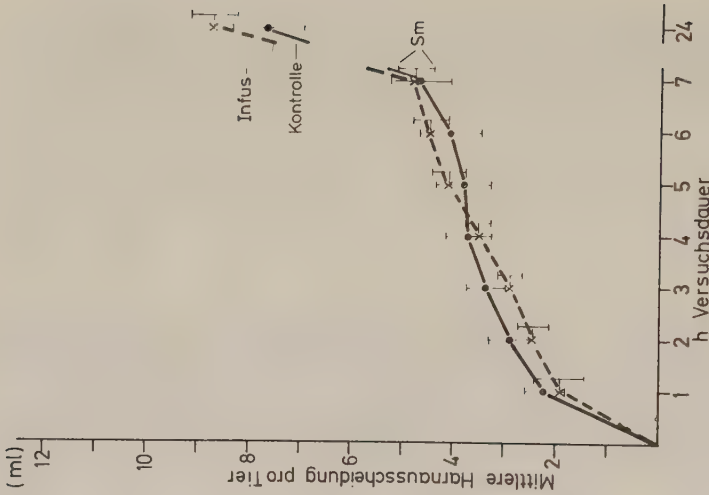


Abb. 48: Diurese nach Sondieren des Infuses (DAB 6) von Herba Ononidis, Gabe 5 ml/Tier.

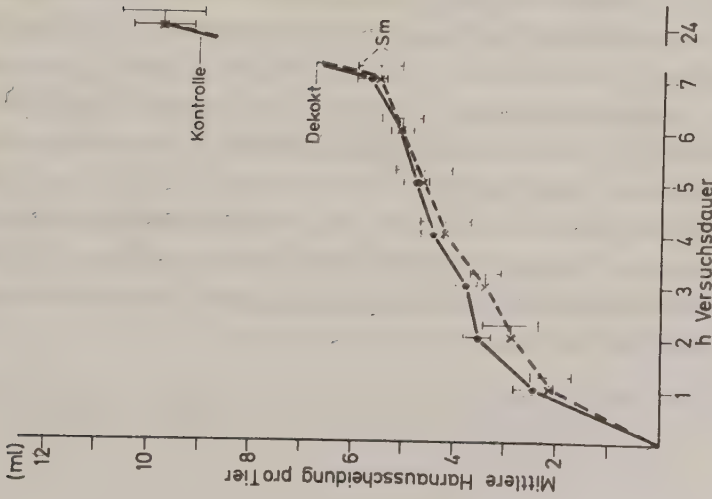


Abb. 49: Diurese nach Sondieren des Dekoktes (DAB 6)
von Radix Ononidis, Gabe 5 ml/Tier.

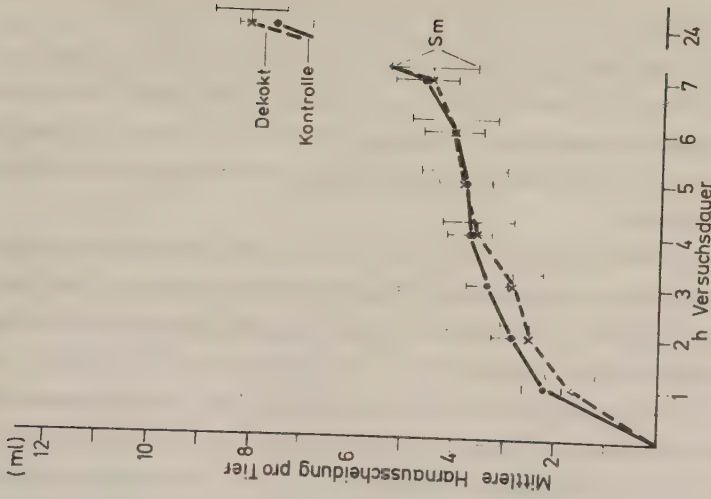


Abb. 50: Diurese nach Sondieren des Dekoktes (DAB 6)
von Herba Ononidis, Gabe 5 ml/Tier.

d) Wäßrige Rückstände der Wasserdampfdestillationen der Wurzeldroge

Nachdem wir die diuretische Wirksamkeit der ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut der dornigen Hauhechel nachgewiesen hatten, hielten wir es für sinnvoll, auch die wäßrigen Rückstände der Wasserdampfdestillationen auf eventuelle Wirkung zu untersuchen. Hierzu verwendeten wir die wäßrigen Rückstände der verschiedenen Destillationszeiten unserer Wurzeldroge.

Die Auswertung dieser Versuche ergab (siehe Tab.10), daß die wäßrigen Rückstände aller Destillationszeiten eine prozentuale Diuresehemmung hervorrufen, deren Maximum - abgesehen von der ersten Versuchsstunde, die wir wegen des Schocks der Sondierung nicht berücksichtigen wollen (siehe S. 63) - in der zweiten Stunde zu finden ist. Die durchschnittliche Diuresehemmung beträgt von der zweiten bis zur siebten Stunde einschließlich für die Rückstände der sechsständigen Destillation 16 %, der vierständigen Destillation 13 %, der zweistündigen Destillation 12 %, der einstündigen Destillation 8 % und der halbstündigen Destillation 7 %.

Mit zunehmender Destillationsdauer der untersuchten Droge nimmt die prozentuale Diuresehemmung der entsprechenden wäßrigen Rückstände zu. Ein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Drogenversuchen kann für die vierundzwanzigste Stunde nach Sondieren der wäßrigen Rückstände der sechsständigen Wasserdampfdestillation ($p = 0,0206$) nachgewiesen werden, wodurch das Vorhandensein eines wasserlöslichen, diuresehemmenden Wirkstoffes (siehe R.Jaretsky und F.Neuwald, 1938) in der Droge bestätigt wird. Offensichtlich geht im Verlaufe der Wasserdampfdestillation in dem Maße wie ätherisches Öl als diuretisch wirksamer Stoff entweicht, dieser diuresehemmende Wirkstoff aus der Droge in den wäßrigen Rückstand über, wo er voll zum Tragen kommt und so die Diuresehemmung verursacht. Eine endgültige Klärung durch Isolierung und Identifizierung des diuresehemmenden Wirkstoffes müssen weitere Versuche geben. Durch diese Versuchsgruppe konnte abgesichert werden, daß für die diuretische Wirksamkeit der Droge allein das ätherische Öl verantwortlich ist.

Die Abbildungen 51 bis 55 zeigen den Verlauf der Diurese nach Sondieren der wäßrigen Rückstände der verschiedenen Wasserdampfdestillationen unserer Wurzeldroge von der ersten bis zur siebten und nach der vierundzwanzigsten Stunde des Versuches.

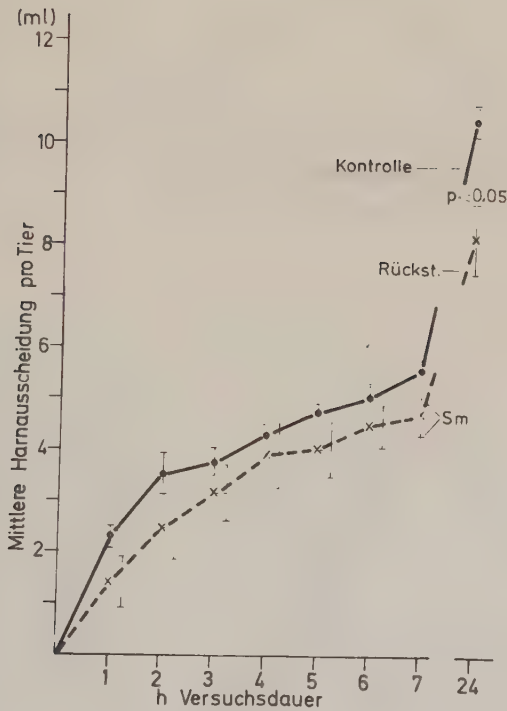


Abb. 51: Diurese nach Sondieren des wäßrigen Rückstandes der sechsständigen Destillation der Wurzeldroge, Gabe 5 ml pro Tier.

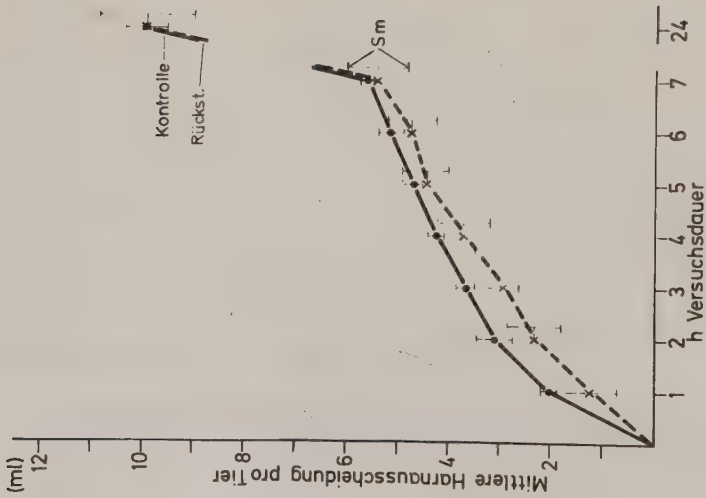


Abb. 52: Diurese nach Sondieren des wäßrigen Rückstandes der vierstündigen Destillation der Wurzeldege, Gabe 5 ml pro Tier.

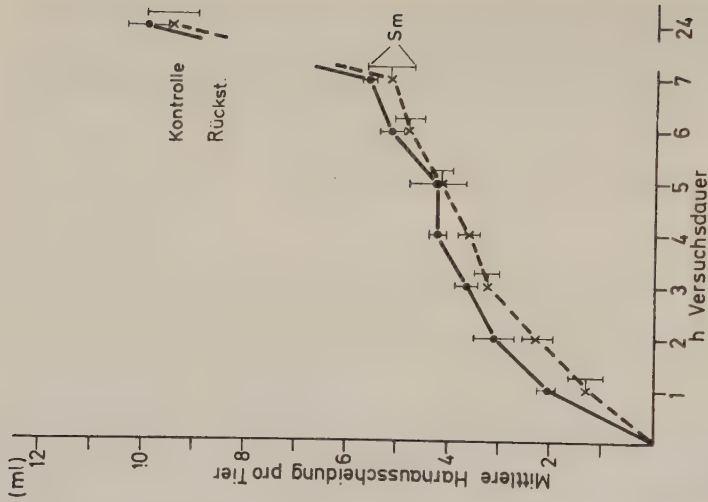


Abb. 53: Diurese nach Sondieren des wäßrigen Rückstandes der zweistündigen Destillation der Wurzeldege, Gabe 5 ml pro Tier.

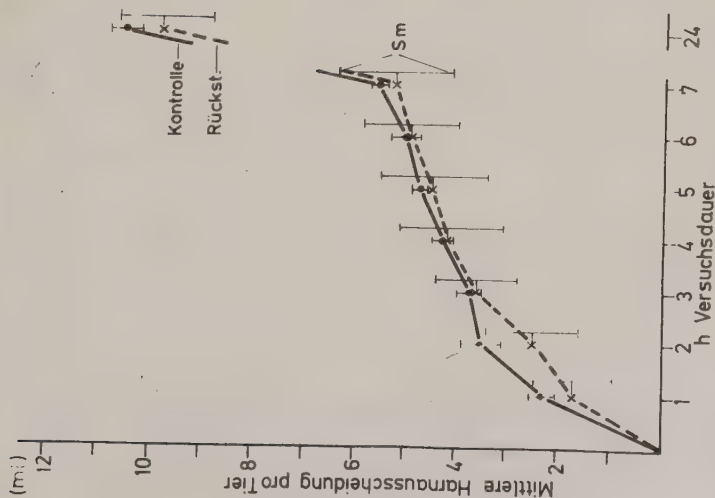


Abb. 54: Diurese nach Sondieren des wäßrigen Rückstandes der einstündigen Destillation der Wurzeldroge, Gabe 5 ml pro Tier.

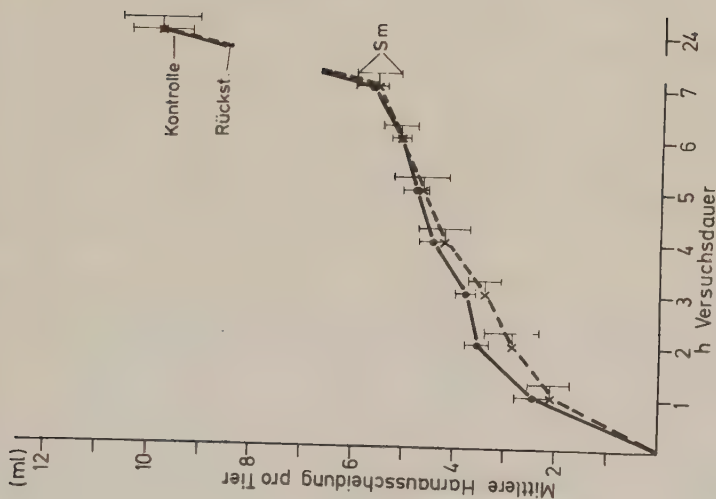


Abb. 55: Diurese nach Sondieren des wäßrigen Rückstandes der halbstündigen Destillation der Wurzeldroge, Gabe 5 ml pro Tier.

Tabelle 10: Diurese nach Sondieren der wässrigen Rückstände der verschiedenen Wasserdampfdestillationen der untersuchten Wurzeldroge von der ersten bis zur siebten und nach der vierundzwanzigsten Stunde des Versuches.

Rad. On. Dest. R.	Dest. dauer 6 ^h 5 ml/Tier		Dest. dauer 4 ^h 5 ml/Tier		Dest. dauer 2 ^h 5 ml/Tier		Dest. dauer 1 ^h 5 ml/Tier		Dest. dauer 1/2 ^h 5 ml/Tier		Vers.- dauer
	Kontr.	Droge	Kontr.	Droge	Kontr.	Droge	Kontr.	Droge	Kontr.	Droge	
$\bar{x}$	2,271	1,408	2,069	1,181	2,069	1,306	2,271	1,713	2,440	2,089	1. ^h
Se	0,430	0,965	0,456	1,192	0,456	0,894	0,430	1,459	0,957	0,954	
Sm	0,215	0,482	0,186	0,487	0,186	0,365	0,215	0,729	0,362	0,389	
n	4	4	6	6	6	6	4	4	7	6	
%	—	-38,0	—	-43,0	—	-36,9	—	-24,6	—	-14,4	
Test	—	t	—	t	—	t	—	t	—	t	
Alpha	—	15,35	—	11,88	—	9,19	—	49,04	—	52,19	2. ^h
$\bar{x}$	3,479	2,450	3,097	2,311	3,097	2,250	3,479	2,471	3,560	2,864	
Se	0,818	1,229	0,892	1,350	0,892	0,744	0,818	1,791	0,675	1,331	
Sm	0,409	0,614	0,364	0,551	0,364	0,304	0,409	0,896	0,255	0,544	
n	4	4	6	6	6	6	4	4	7	6	
%	—	-29,6	—	-25,4	—	-27,4	—	-29,0	—	-19,5	
Test	—	t	—	t	—	t	—	t	—	t	
Alpha	—	21,26	—	26,14	—	10,43	—	34,53	—	24,88	3. ^h
$\bar{x}$	3,754	3,150	3,669	2,933	3,669	3,250	3,754	3,600	3,788	3,419	
Se	0,554	1,110	0,549	0,750	0,549	0,573	0,554	1,588	0,428	0,825	
Sm	0,277	0,555	0,224	0,306	0,224	0,234	0,277	0,794	0,162	0,337	
n	4	4	6	6	6	6	4	4	7	6	
%	—	-16,1	—	-20,1	—	-11,4	—	-4,1	—	-9,7	
Test	—	t	—	t	—	t	—	t	—	t	
Alpha	—	36,77	—	8,11	—	22,46	—	86,06	—	32,24	4. ^h
$\bar{x}$	4,308	3,883	4,261	3,678	4,261	3,611	4,308	4,175	4,462	4,200	
Se	0,390	1,229	0,443	1,225	0,443	0,578	0,390	1,983	0,746	1,165	
Sm	0,195	0,615	0,181	0,500	0,181	0,236	0,195	0,992	0,282	0,476	
n	4	4	6	6	6	6	4	4	7	6	
%	—	-9,9	—	-13,7	—	-15,3	—	-3,1	—	-5,9	
Test	—	t	—	t	—	t	—	t	—	t	
Alpha	—	53,43	—	29,83	—	5,38	—	59,94	—	63,34	5. ^h
$\bar{x}$	4,750	4,017	4,722	4,456	4,722	4,214	4,750	4,525	4,786	4,656	
Se	0,342	1,110	0,500	1,082	1,263	0,696	0,342	2,270	0,649	1,319	
Sm	0,171	0,555	0,204	0,446	0,516	0,284	0,171	1,135	0,245	0,538	
n	4	4	6	6	6	6	4	4	7	6	
%	—	-15,4	—	-5,6	—	-0,2	—	-4,7	—	-2,7	
Test	—	t	—	t	—	t	—	t	—	t	
Alpha	—	25,37	—	59,85	—	98,90	—	85,72	—	82,11	6. ^h
$\bar{x}$	5,058	4,517	5,150	4,767	5,150	4,814	5,058	4,942	5,105	5,117	
Se	0,582	0,787	0,633	1,243	0,633	0,807	0,582	1,827	0,606	0,939	
Sm	0,291	0,394	0,259	0,507	0,259	0,330	0,291	0,814	0,229	0,383	
n	4	4	6	6	6	6	4	4	7	6	
%	—	-10,7	—	-7,4	—	-6,5	—	-2,3	—	0,2	
Test	—	t	—	t	—	t	—	t	—	t	
Alpha	—	31,08	—	51,61	—	44,10	—	90,72	—	97,85	7. ^h
$\bar{x}$	5,579	4,708	5,608	5,414	5,608	5,147	5,579	5,254	5,688	5,556	
Se	0,398	0,865	0,376	1,442	0,376	0,989	0,398	2,261	0,791	1,089	
Sm	0,199	0,432	0,154	0,589	0,154	0,404	0,199	1,130	0,299	0,444	
n	4	4	6	6	6	6	4	4	7	6	
%	—	-15,6	—	-3,5	—	-8,2	—	-5,8	—	-2,3	
Test	—	t	—	t	—	t	—	t	—	t	
Alpha	—	11,70	—	76,22	—	31,09	—	79,56	—	80,42	24. ^h
$\bar{x}$	10,538	8,183	9,969	9,956	9,969	9,414	10,538	9,850	9,807	9,819	
Se	0,621	1,376	1,052	2,297	1,052	1,325	0,621	1,806	1,544	1,926	
Sm	0,310	0,688	0,429	0,938	0,429	0,541	0,310	0,903	0,584	0,786	
n	4	4	6	6	6	6	4	4	7	6	
%	—	-22,3	—	-0,1	—	-5,6	—	-6,5	—	0,1	
Test	—	t	—	t	—	t	—	t	—	t	
Alpha	—	2,06	—	98,95	—	43,98	—	49,87	—	99,00	

($\bar{x}$ = Mittelwert, Se = Standardabweichung des Mittelwertes, Sm = Fehler des Mittelwertes, n = Anzahl der Meßwerte,
% = prozentuale Unterschiede zwischen Kontroll- u. Drogenversuchen, Test = durchgeführter Test = t-Test nach Student [t]
bzw. Mann-Whitney-Test [M], Alpha = Irrtumswahrscheinlichkeit)

4. Angabe eines Standards

Nach G. Ehrhart und H. Ruschig (1972) war "bis zur Einführung der Quecksilber-Diuretica in den zwanziger Jahren das zu den Xanthinen gehörende Theophyllin das einzig brauchbare synthetische Diureticum". So entschlossen wir uns, als Maß für den diuretischen Effekt der von uns untersuchten ätherischen Öle den Tieren verschiedenen konzentrierte Lösungen von Theophyllinnatriumsalicylat (Theophyllino-natrium salicylicum "Knoll") in einer Milch-Wasser-Emulsion zu verabreichen.

Dabei beobachteten wir (siehe Tab.11), daß Gaben von 20 mg Theophyllinnatriumsalicylat pro Tier in der zweiten ($p = 0,0282$), dritten ($p = 0,0193$), vierten ($p = 0,0368$), sechsten ($p = 0,0141$) und siebten Stunde ($p = 0,0176$) eine signifikante, in der fünften Stunde ($p = 0,0097$) eine sehr signifikante Diuresesteigerung hervorriefen. Die Versuchstiere schieden von der zweiten bis zur siebten Stunde einschließlich durchschnittlich 40 % mehr Harn als die Kontrolltiere aus, wobei die größte prozentuale Harnvermehrung mit 74 % in der zweiten Stunde zu finden war. Es folgte die dritte Stunde mit 48 %, die vierte Stunde mit 36 %, die fünfte Stunde mit 29 %, die siebte Stunde mit 27 % und die sechste Stunde mit 26 %.

Einzelgaben von 10 und 40 mg Theophyllinnatriumsalicylat bewirkten keine signifikant vermehrte Harnausscheidung. Eine Erklärung hierfür dürfte sein, daß 10 mg der Substanz unterdosiert bzw. 40 mg überdosiert sind.

Abbildung 56 zeigt den Verlauf der Diuresis nach Sondieren von 20 mg Theophyllinnatriumsalicylat pro Tier.

Tabelle 11: Diurese nach Sondieren von 10, 20 und 40 mg Theophyllinnatumsalicylat pro Tier von der ersten bis zur siebten und nach der vierundzwanzigsten Stunde des Versuches.

	Kontr.	Theo. 10 mg	Kontr.	Theo. 20 mg	Kontr.	Theo. 40 mg	
$\bar{x}$	0,962	0,875	0,962	1,778	0,962	0,583	1. $\frac{h}{h}$
Se	0,752	0,250	0,752	1,179	0,752	0,376	
Sm	0,227	0,125	0,227	0,393	0,227	0,154	
n	11	4	11	9	11	6	
%	—	-9,1	—	84,8	—	-39,4	
Test	—	t	—	t	—	t	
Alpha	—	82,74	—	7,64	—	26,99	
$\bar{x}$	1,833	2,125	1,833	3,185	1,833	2,083	2. $\frac{h}{h}$
Se	1,065	0,854	1,065	1,468	1,065	0,585	
Sm	0,321	0,427	0,321	0,489	0,321	0,239	
n	11	4	11	9	11	6	
%	—	15,9	—	73,7	—	13,6	
Test	—	t	—	t	—	t	
Alpha	—	63,24	—	2,82	—	60,50	
$\bar{x}$	2,697	2,625	2,697	4,000	2,697	3,250	3. $\frac{h}{h}$
Se	0,983	0,479	0,983	1,288	0,983	0,894	
Sm	0,296	0,239	0,296	0,429	0,296	0,365	
n	11	4	11	9	11	6	
%	—	-2,7	—	48,3	—	20,5	
Test	—	t	—	t	—	t	
Alpha	—	89,22	—	1,93	—	27,13	
$\bar{x}$	3,492	3,625	3,492	4,741	3,492	4,125	4. $\frac{h}{h}$
Se	0,820	0,629	0,820	1,604	0,820	1,137	
Sm	0,247	0,315	0,247	0,535	0,247	0,464	
n	11	4	11	9	11	6	
%	—	3,8	—	35,7	—	18,1	
Test	—	t	—	t	—	t	
Alpha	—	77,57	—	3,68	—	20,38	

	Kontr.	Theo. 10 mg	Kontr.	Theo. 20 mg	Kontr.	Theo. 40 mg	
$\bar{x}$	4,303	4,375	4,303	5,556	4,303	4,667	5. $\frac{h}{h}$
Se	0,759	0,479	0,759	1,170	0,759	1,252	
Sm	0,229	0,239	0,229	0,390	0,229	0,511	
n	11	4	11	9	11	6	
%	—	1,7	—	29,1	—	8,5	
Test	—	t	—	t	—	t	
Alpha	—	86,38	—	0,97	—	46,34	
$\bar{x}$	4,742	5,000	4,742	5,963	4,742	5,917	6. $\frac{h}{h}$
Se	0,804	0,408	0,804	1,198	0,804	1,686	
Sm	0,242	0,204	0,242	0,399	0,242	0,688	
n	11	4	11	9	11	6	
%	—	5,4	—	25,7	—	24,8	
Test	—	t	—	t	—	t	
Alpha	—	55,71	—	1,41	—	6,75	
$\bar{x}$	5,015	5,250	5,015	6,352	5,015	6,083	7. $\frac{h}{h}$
Se	1,034	0,500	1,034	1,257	1,034	1,594	
Sm	0,312	0,250	0,312	0,419	0,312	0,651	
n	11	4	11	9	11	6	
%	—	4,7	—	26,7	—	21,3	
Test	—	t	—	t	—	t	
Alpha	—	67,51	—	1,76	—	11,27	
$\bar{x}$	10,111	9,250	10,111	9,444	10,111	10,833	24. $\frac{h}{h}$
Se	1,387	1,258	1,387	1,537	1,387	1,722	
Sm	0,462	0,629	0,462	0,512	0,462	0,703	
n	9	4	9	9	9	6	
%	—	-8,5	—	-6,6	—	7,1	
Test	—	M	—	M	—	M	
Alpha	—	10,63	—	66,65	—	95,46	

($\bar{x}$ = Mittelwert, Se = Standardabweichung des Mittelwertes, Sm = Fehler des Mittelwertes, n = Anzahl der Meßwerte, % = prozentualer Unterschied zwischen Kontroll- u. Drogenversuchen, Test = durchgeführter Test = t-Test nach Student [t] bzw. Mann-Whitney-Test [M], Alpha = Irrtumswahrscheinlichkeit)

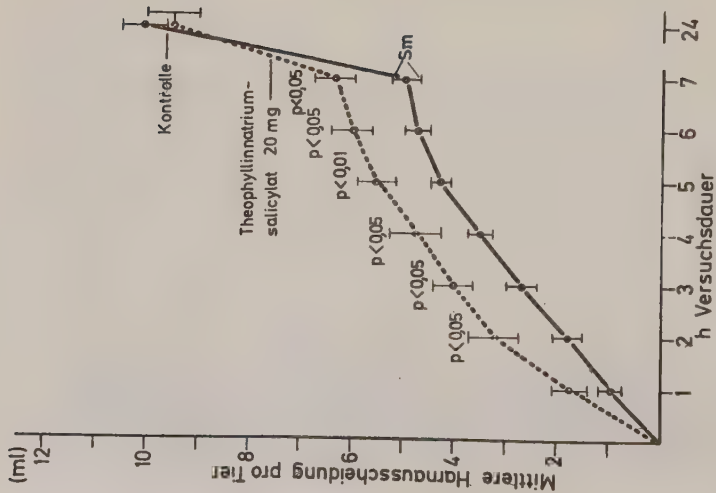


Abb. 56: Diurese nach Sondieren von Theophyllinnatrium-salicylat, Gabe 20 mg pro Tier.

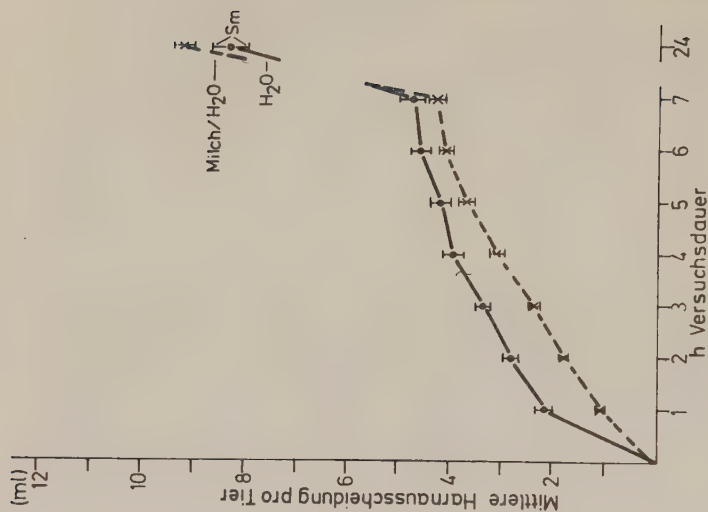


Abb. 57: Diurese nach Sondieren von Wasser bzw. einer Milch-Wasser-Emulsion, Gabe 5 ml pro Tier.

Der zum Vergleich betrachtete Verlauf der Diurese beim Normaltier nach Sondieren von Wasser bzw. einer Milch-Wasser-Emulsion zeigte Kurven mit steilem Anstieg, wobei die Kurve der Wasser-Tiere bedeutend steiler verlief als die Kurve der Milch-Wasser-Tiere (siehe Abb.57). Die durchschnittliche Diuresehemmung der Milch-Wasser-Tiere gegenüber den Wasser-Tieren betrug von der zweiten bis zur siebten Stunde einschließlich 20 % mit der stärksten Hemmung von 35 % in der zweiten Stunde.

Im Hinblick auf die Ergebnisse unserer Drogenversuche war von Bedeutung, daß der Verlauf der Diurese beim Normaltier nach Sondieren von Wasser bzw. einer Milch-Wasser-Emulsion sowohl innerhalb eines Versuches als auch von Versuch zu Versuch erhebliche Schwankungen aufwies.

Tabelle 12 charakterisiert die Diurese nach Sondieren von Wasser bzw. einer Milch-Wasser-Emulsion von der ersten bis zur siebten Stunde und nach der vierundzwanzigsten Stunde des Versuches.

Tabelle 12: Diurese nach Sondieren von Wasser bzw. einer Milch-Wasser-Emulsion von der ersten bis zur siebten und nach der vierundzwanzigsten Stunde des Versuches.

	Wasser	Milch-Wasser		Wasser	Milch-Wasser	
$\bar{x}$	2,152	1,126		4,229	3,688	
Se	1,030	0,996		1,150	1,371	
Sm	0,195	0,109		0,217	0,150	
n	28	83	1. $\frac{h}{h}$	28	83	5. $\frac{h}{h}$
%	—	-47,7		—	-12,8	
Test	—	M		—	t	
Alpha	—	0,01		—	6,31	
$\bar{x}$	2,830	1,830		4,616	4,098	
Se	1,000	1,133		1,115	1,439	
Sm	0,189	0,124		0,211	0,158	
n	28	28	2. $\frac{h}{h}$	28	83	6. $\frac{h}{h}$
%	—	-35,4		—	-11,2	
Test	—	t		—	t	
Alpha	—	0,01		—	8,57	
$\bar{x}$	3,354	2,386		4,768	4,367	
Se	0,879	1,282		1,481	1,567	
Sm	0,166	0,141		0,280	0,172	
n	28	83	3. $\frac{h}{h}$	28	83	7. $\frac{h}{h}$
%	—	-28,9		—	-8,4	
Test	—	t		—	M	
Alpha	—	0,03		—	49,87	
$\bar{x}$	3,943	3,074		8,301	9,264	
Se	1,055	1,363		1,795	2,152	
Sm	0,199	0,150		0,339	0,244	
n	28	83	4. $\frac{h}{h}$	28	78	24. $\frac{h}{h}$
%	—	-22,0		—	11,6	
Test	—	t		—	M	
Alpha	—	0,27		—	24,02	

($\bar{x}$ = Mittelwert, Se = Standardabweichung des Mittelwertes, Sm = Fehler des Mittelwertes, n = Anzahl der Meßwerte, % = prozentualer Unterschied zwischen Kontroll- u. Drogenversuchen, Test = durchgeführter Test = t-Test nach Student [t] bzw. Mann-Whitney-Test [M], Alpha = Irrtumswahrscheinlichkeit)

5. Bestimmung der Na^+ -, K^+ - und Cl^- -Ionenkonzentrationen

Die diuretische Wirksamkeit der ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut von *Ononis spinosa* L. konnte - in bezug auf vermehrte Harnausscheidung - durch moderne statistische Methoden (siehe S. 134) abgesichert werden. Da jedoch für eine Therapie vor allem die vermehrte Salzausscheidung von Bedeutung ist, wurde der Na^+ - und K^+ -Ionengehalt der nach Sondieren ätherischer Wurzel- und Krautöle ausgeschiedenen Harne bestimmt und mit den dazugehörigen Kontrollen verglichen. Zur Untersuchung gelangten Harne der Hauptversuchsgruppen.

Die Auswertung dieser für die ätherischen Öle der dornigen Hauhechel erstmalig durchgeführten Bestimmungen zeigte, daß es sich bei ihrer diuretischen Wirksamkeit in der Regel um eine gesteigerte Wasserausscheidung ohne vermehrte Salzausscheidung handelt. Zwar konnte in einigen Versuchen eine geringe Steigerung der Na^+ - und K^+ -Ionenkonzentrationen beobachtet werden, wogegen in anderen Versuchen eine schwache Hemmung der Ionenausscheidung zu verzeichnen war. Insgesamt konnten Änderungen der Na^+ - und K^+ -Ionenkonzentrationen für keine Versuchsgruppe statistisch abgesichert werden. Auch die Bestimmung des Cl^- -Ionengehaltes ergab keine nennenswerten Unterschiede der Ionenkonzentrationen von Kontroll- und Versuchsharnen. Als Beispiel sei Tabelle 13, die Mittelwerte aus drei typischen Versuchen (20, 47 und 67) darstellt, aufgeführt.

Tabelle 13: Na^+ -, K^+ - und Cl^- -Ionengehalt der nach zwei und sieben Stunden gesammelten Harne von Kontroll- und Drogentieren nach Sondieren von 1,0 mg pro Tier des durch vierstündige Wasserdampfdestillation gewonnenen ätherischen Öles aus den Wurzeln der Droge (mVal pro Tier ausgeschiedener Ionen nach zwei bzw. sieben Stunden).

	Na^+ -Gehalt mVal / Tier	K^+ -Gehalt mVal / Tier	Cl^- -Gehalt mVal/Tier	
Kontrolle	0,154	0,311	0,178	2-Stunden-Harn
Rad. Onon. äther. Öl	0,160	0,265	0,175	
Kontrolle	0,368	1,053	0,489	7-Stunden-Harn
Rad. Onon. äther. Öl	0,361	0,978	0,503	

Nach diesen Ergebnissen sahen wir davon ab, weitere für die Beurteilung wichtige Parameter wie den Ionenquotienten und den Na/K-Ionenquotienten (siehe G.Ehrhart und H.Ruschig, 1972) zu erarbeiten. Sicher dürfen, da die Natriumausscheidung der Schlüssel für jede Ödemtherapie ist (siehe G.Ehrhart und H.Ruschig, 1972) keine unberechtigten Erwartungen in die medizinische Wirkung der ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut der vorliegenden Droge gesetzt werden. Auf Grund der signifikant vermehrten Harnausscheidung ist jedoch eine therapieunterstützende Funktion der ätherischen Öle in geeigneter Zubereitung zu diskutieren.

VII. Diskussion der Versuchsergebnisse

Über die ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut von *Ononis spinosa* L. liegen in der Literatur bislang nur wenige Angaben vor. Nach unseren Untersuchungen ist der Gehalt an ätherischem Öl in der Wurzeldroge nach einer Destillationsdauer von 1/2 Stunde 0,009 % und von 6 Stunden 0,021 %; die Krautdroge liefert nach 6 Stunden 0,028 % ätherisches Öl. Längere Destillationszeiten ergeben keine größere Ausbeute an wasserdampf-
flüchtigen Substanzen. Durch dieses Ergebnis wird der von H. Haensel (1910) für die Wurzel-
droge angegebene Gehalt von 0,02 % an ätherischem Öl bestätigt, während der von F. Neuwald (1939) ermittelte Wert von 0,2 % selbst dann zu hoch erscheint, wenn eine andere Herkunft oder auch ein bestimmter Entwicklungszustand der Pflanze berücksichtigt werden.

Physikalische und chemische Kennzahlen, UV-, IR- und ^1H -NMR-Spektren sowie Dünnschicht- und Gaschromatogramme sind in der Literatur für die ätherischen Öle der Wurzel- und Krautdroge nicht angegeben. Diese von uns durchgeführte Charakterisierung ergab, daß beide einen großen Anteil freier Fettsäuren enthalten, ansonsten jedoch unterschiedlich zusammengesetzt sind.

Die ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut sind schon durch Geruch und Konsistenz leicht zu unterscheiden. Während das ätherische Öl der Wurzeldroge bei Zimmertemperatur butterartige Konsistenz besitzt, ist das ätherische Krautöl fest. Letzteres ist durch einen höheren Gehalt gesättigter Fettsäuren bedingt. Weitere Charakteristika der ätherischen Öle aus beiden Pflanzenteilen sind eine hohe Säure- und Verseifungszahl, niedrige Jodzahl sowie eine schwache optische Drehung.

Säure- und Verseifungszahl des ätherischen Krautöles sind größer, Jodzahl und optische Drehung kleiner als die des ätherischen Wurzelöles.

Der hohe Anteil an freien Fettsäuren wird auch durch die IR- und ^1H -NMR-Spektren der ätherischen Öle bestätigt. Die unterschiedliche Zusammensetzung der ätherischen Öle geht ferner aus ihren UV-Spektren hervor.

Die quantitative Auftrennung der ätherischen Öle nach Verbindungsklassen bestätigt, daß freie Fettsäuren tatsächlich den größten Anteil beider ätherischen Öle bilden. Diese Fraktion nimmt mit fortschreitender Wasserdampfdestillation zu. Die Untersuchung der Fettsäurefraktionen beider ätherischen Öle ergab u. a. als Hauptbestandteil Palmitinsäure

(über die widersprüchlichen Angaben hinsichtlich der Wasserdampflichkeit langkettiger Fettsäuren siehe z.B. K.H.Bauer und H.Moll, 1954; E.Gildemeister und F.Hoffmann, 1966, sowie H.Kating und Mitarb., 1970).

Als Inhaltsstoff des ätherischen Wurzelöles wurde in der Literatur bis jetzt nur Spinosin genannt (F.Neuwald, 1939). Diese angeblich in 50 %iger Ausbeute gewonnene und als Phytosterin angesprochene Substanz konnte von uns nicht isoliert werden. Nach der von F.Neuwald angegebenen Aufarbeitung erhielten wir farblose Kristalle, die als Palmitinsäure identifiziert wurden. Da sich die von F.Neuwald für Spinosin angegebenen Analysendaten jedoch so eindeutig von denen der Palmitinsäure unterscheiden, können beide Substanzen nicht identisch sein. Weitere Untersuchungen sind zur Klärung dieser Frage erforderlich.

Als Bestandteil des ätherischen Öles der Wurzeldroge wurden Menthon, Isomenthon, Campher, Linalool, Menthol, Estragol, Borneol, Carvon sowie cis- und trans-Anethol, des ätherischen Öles der Krautdroge Palmitinsäuremethyl- und Palmitinsäureäthylester identifiziert. Zudem wurde im ätherischen Krautöl nach Verseifen α -Terpineol nachgewiesen. Terpinenol-4, das die diuretisch wirksame Komponente des ätherischen Wacholderöles darstellt (I.Janku et al., 1957), konnte dagegen ausgeschlossen werden. Anethol stellt von diesen Substanzen die Hauptkomponente des ätherischen Wurzelöles dar.

In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß die von uns als Untersuchungsmaterial verwendete und vom Balkan bezogene Wurzeldroge verglichen mit den auf Versuchsfeldern des Instituts für Pharmazeutische Biologie in Marburg/Lahn kultivierten Wurzeln an Hand ihrer Dünnschichtchromatogramme quantitative Unterschiede der ätherischen Öle aufweist, deren Ursache wahrscheinlich in klimatischen Einflüssen sowie im Zeitpunkt der Ernte und damit im Entwicklungszustand der Pflanze zu suchen ist. Auch das Vorhandensein verschiedener Unterarten kann für dieses Ergebnis verantwortlich sein. Da weder Belegexemplare noch genauere Angaben bezüglich der Balkanware zu erhalten waren, muß eine endgültige Klärung dieser Frage weiteren, vergleichenden Untersuchungen vorbehalten bleiben.

In den Kohlenwasserstoff-Fractionen aus Wurzel und Kraut der Droge werden einerseits die gleichen Verbindungen wie 1-Methylnaphthalin, 2-Methylnaphthalin, Diphenyl, Dimethylnaphthalin, Trimethylnaphthalin, Fluoren, Stilben, Phenanthren und Fluoranthren, andererseits aber auch unterschiedliche Stoffzusammensetzungen nachgewiesen. So enthält das ätherische Wurzelöl Naphthalin und Gammexan, während das ätherische Krautöl Acenaphthen und Pyren aufweist. Aromatische Kohlenwasserstoffe sind bislang nur wenige in Pflanzen gefunden worden (siehe hierzu E. Gildemeister und F. Hoffmann, 1960). Daher ist zu vermuten, daß es sich bei den oben angesprochenen Verbindungen größtenteils um aus der Umwelt aufgenommene Substanzen und nicht um echte Inhaltsstoffe der ätherischen Öle handelt. Polycyclische, aromatische Kohlenwasserstoffe können durch Abgase auf die neben einer stark befahrenen Straße in Marburg/Lahn gelegenen *Ononis spinosa* -Kulturen gelangt sein.

Kachler (1869) berichtet über das Vorkommen von Stilben im Perubalsam; Hydroxystilbene sind in der Familie der Pinaceae (G. Lindstedt und A. Misiorny, 1951) sowie in verschiedenen Eucalyptus-Arten frei und glykosidisch gebunden vorzufinden (D. E. Hathway und J. W. T. Seakins, 1959; W. E. Hillis, 1966). Über das Vorkommen von unsubstituiertem Stilben in der Kohlenwasserstoff-Fraktion von *Alnus firma* Sieb. et Zucc. berichtet Y. Asakawa (1970), der eine Biosynthese dieses Kohlenwasserstoffes aus Shikimisäure und Acetat postuliert. Somit dürfte es sich bei dem sowohl in der Wurzel als auch im Kraut der vorliegenden Droge nachgewiesenen Kohlenwasserstoff trans-Stilben um einen genuine Pflanzeninhaltsstoff handeln. Weiter wird in verschiedenen ätherischen Ölen das Vorhandensein von Naphthalin (Storaxrindenöl und Nelkenstielöl von *Eugenia caryophyllata*, Irisöl von *Iris germanica*, Costuswurzelöl von *Saussurea lappa*, Birkenknospenöl, Öl von Reiskeimlingen) sowie Methylnaphthalin und Dimethylnaphthalin (Öl von Reiskeimlingen) beschrieben (W. Karrer, 1958), die als Pflanzeninhaltsstoffe angesprochen werden. Die Frage, ob es sich hierbei um echte Inhaltsstoffe oder um aus der Umwelt aufgenommene Substanzen handelt, muß zur Zeit noch offen bleiben.

Gammexan, in der vom Balkan stammenden Wurzeldroge nachgewiesen, ist eine häufig als Insektizid verwendete chemische Verbindung, die in das ätherische Öl entweder durch Aufnahme der Pflanze aus der Natur (siehe H. Beitz, F. Seefeld und F. Pank, 1973) oder

durch Zusatz zur Droge gegen Insektenfraß gelangt sein kann. Die quantitative Bestimmung dieser Substanz ergibt einen Anteil von 0,4 ppm für die Droge, was dem in der Literatur beschriebenen Wert einer mit Gammexan gespritzten Pfefferminze nach zweimonatiger Wartezeit entspricht (siehe hierzu H. Friedrich und H.G. Büter, 1974). Für Infuse, die nach Vorschrift des Arzneibuches aus einem Teil Droge auf zehn Teile Aufguß zubereitet werden, ergibt sich somit ein Gehalt von 0,04 ppm dieser Substanz. Vergleicht man diesen Wert mit dem in der Höchstmengenverordnung tierischer Lebensmittel vom 15. November 1973 angegebenen höchstzulässigen Gehalt von 0,007 ppm an Gammexan in Milch, so ist die Therapie dieser wäßrigen Zubereitung der Droge als bedenklich anzusehen. In diesem Zusammenhang wirkt noch erschwerend, daß ein kranker Organismus empfindlicher als ein gesunder reagiert (H. Friedrich und H.G. Büter, 1975) sowie daß Phytotherapeutika meist über einen längeren Zeitraum gegeben werden (R. Hänsel, 1975).- Es sei schließlich erwähnt, daß die Krautdroge bei unseren Untersuchungen (im Gegensatz zur Wurzeldroge) so schwere allergische Reaktionen hervorrief, daß von der Dermatologischen Klinik der Philipps-Universität Marburg/L. zu einem sofortigen Abbruch der Arbeiten mit der Krautdroge geraten wurde.

Die pharmakologischen Untersuchungen zeigten, daß die ätherischen Öle der Droge bereits nach Gaben von 0,25 mg pro Tier eine prozentual gesteigerte Harnausscheidung verursachen, deren Maximum nach Gaben von 0,5 bzw. 1,0 mg pro Tier liegt. Durch dieses Ergebnis werden die Angaben von R. Jaretsky und F. Neuwald (1938 u. 1939) bezüglich des wasserdampfflüchtigen, diuresefördernden Inhaltsstoffes der Wurzeldroge generell bestätigt, während die von H. Vollmer und A. Giebel (1938; siehe hierzu auch H. Vollmer, 1940) vorwiegend nicht wasserdampfflüchtigen Substanzen zugeschriebene diuretische Wirksamkeit der Wurzeln zumindest zweifelhaft erscheint.

Eine signifikante diuretische Wirksamkeit ist von der durch die Destillationsdauer bedingten Zusammensetzung sowie der Einzelgabe des jeweiligen ätherischen Öles abhängig, so daß einschränkende Differenzierungen notwendig werden. Die Tatsache, daß bei der Wurzel ausschließlich Einzelgaben von 1,0 mg des "Vierstunden-Öles" sowie 0,5 mg des "Zweistunden-Öles" und beim Kraut 0,5 mg des "Sechsstunden-Öles" signifikant diuretisch wirksam sind, könnte dadurch eine Erklärung finden, daß nur hier ein optimales Verhältnis der wirksamen Substanzen vorliegt. Bei allen übrigen Gaben und

Destillationszeiten der ätherischen Öle dürfte es sich um eine Über- bzw. Unterdosierung handeln.

Als diuretisch allein wirksam konnte keine bestimmte Fraktion oder Verbindung der ätherischen Öle nachgewiesen werden. Auf Grund unserer Versuche wurde deutlich, daß mehrere in den verschiedenen Fraktionen sowie im ätherischen Restöl lokalisierte Verbindungen bzw. das ätherische Gesamtöl für die diuretische Wirksamkeit verantwortlich sind.

Bei der diuretischen Wirksamkeit der ätherischen Öle handelt es sich um eine gesteigerte Wasserausscheidung ohne vermehrte Salzausscheidung. Da aber nach G. Ehrhart und H. Ruschig (1972) die Na^+ -Ausscheidung der Schlüssel für jede Ödemtherapie ist, dürfen keine unberechtigten Erwartungen in die medizinische Wirksamkeit der ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut der untersuchten Droge gesetzt werden.

Die als Standard für die diuretische Wirksamkeit der ätherischen Öle geprüften verschiedenen konzentrierten Lösungen von Theophyllinnatriumsalicylat (10, 20 und 40 mg pro Tier) zeigten, daß Einzelgaben von 20 mg dieses Diuretikums in etwa Einzelgaben von 0,5 mg des durch zweistündige Wasserdampfdestillation gewonnenen ätherischen Öles der Wurzeldroge entsprechen; Gaben von 10 bzw. 40 mg Theophyllinnatriumsalicylat bewirken keine signifikant vermehrte Harnausscheidung, was wiederum als Unter- bzw. Überdosierung gewertet werden muß.

Infuse und Dekokte aus Wurzel und Kraut der Droge, hergestellt nach Vorschrift des DAB 6 und 7 sowie analog der Vorschrift des DAB 6 in unterschiedlicher Konzentration und Verdünnung, sind hinsichtlich ihrer diuretischen Wirksamkeit nicht signifikant von den dazugehörigen Kontrollen zu unterscheiden. Aus den prozentualen Werten geht hervor, daß es sich hier - mit Ausnahme bei den Infusen der Wurzeldroge - um eine verminderte Harnausscheidung handelt. Dieser Befund steht bezüglich der Wurzeldroge im Einklang mit den Ergebnissen von R. Jaretsky und F. Neuwald (1938, Infuse u. Dekokte) sowie E. Herre (1937, Infuse), während die Angaben der anderen Autoren (vgl. S. 60) nicht bestätigt werden können (siehe auch: R. Jaretsky und A. Sievers, 1933, Dekokt der Krautdroge).

Unsere Versuchsergebnisse finden eine Erklärung wohl darin, daß in der Droge neben dem ätherischen Öl, dem diuretisch wirksamen Bestandteil, ein wasserlöslicher, diuresehemmender Wirkstoff vorhanden ist (siehe R. Jaretsky und F. Neuwald, 1938 u. 1939).

Hierzu gibt es folgende Hinweise: Durch kurzes Erhitzen (siehe Zubereitung von Infusen nach dem DAB 6) der Wurzeldroge wird ein Teil des diuretisch wirksamen ätherischen Öles aus der Droge und ihrem Infus entfernt; der noch verbleibende Rest des ätherischen Öles verursacht eine schwache Diuresesteigerung. Bei der Krautdroge genügt ein kurzes Erhitzen, um das gesamte ätherische Öl aus der Droge und ihrem Infus zu entfernen; es resultiert daraus eine leichte prozentuale Verminderung der Harnausscheidung. Längeres Erhitzen (siehe Zubereitung von Dekokten nach DAB 6) verdrängt sowohl aus der Wurzel- als auch aus der Krautdroge und ihren Dekokten das gesamte ätherische Öl, woraus die eintretende leichte prozentuale Diuresehemmung zu erklären ist.

In diesem Zusammenhang war es weiter interessant, die wäßrigen Rückstände der verschiedenen Destillationszeiten unserer Wurzeldroge auf eventuelle diuretische Wirksamkeit zu prüfen. Die Auswertung dieser Versuche ergab, daß die wäßrigen Rückstände aller Destillationszeiten (1/2, 1, 2, 4 und 6 Stunden) eine prozentuale Diuresehemmung bewirken, die mit steigender Destillationsdauer kontinuierlich zunimmt und für den wäßrigen Rückstand der sechsstündigen Wasserdampfdestillation einen signifikanten Unterschied zeigt. Auch dieses Ergebnis kann nur damit erklärt werden, daß in dem Maße wie ätherisches Öl als diuretisch wirksamer Bestandteil entweicht, die diuresehemmende Komponente der Droge zur Wirkung kommt.

Auf Grund dieser Befunde bei Infusen, Dekokten und wäßrigen Rückständen der Droge ist das Vorhandensein eines diuresehemmenden Wirkstoffes in der Droge sehr wahrscheinlich, wodurch auch in diesem Punkt die Angaben von R.Jaretsky und F.Neuwald (1938) bestätigt werden, während die von H.Vollmer und A.Giebel (1938) beschriebenen Beobachtungen nicht mit unseren Ergebnissen übereinstimmen. Eine endgültige Klärung durch Isolierung und Identifizierung des diuresehemmenden Stoffes muß weiteren Versuchen vorbehalten bleiben. Nach unseren Ergebnissen dürfte gesichert sein, daß für die diuretische Wirksamkeit der Droge allein das ätherische Öl verantwortlich ist, weshalb weder Infuse noch Dekokte (siehe DAB 7 DDR, ÖAB 9) eine geeignete Zubereitungsform der Droge darstellen.

VIII. Zusammenfassung

- 1) Es wurden die ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut von *Ononis spinosa* L. phytochemisch und pharmakologisch untersucht. Die Wurzeldroge wurde vom Balkan bezogen. Die Krautdroge sowie die zu vergleichenden Untersuchungen verwendete Wurzel-
droge stammte von den auf Versuchsfeldern des Instituts für Pharmazeutische Biologie in Marburg/Lahn kultivierten *Ononis spinosa*-Pflanzen sowie von verschiedenen in der Umgebung von Marburg/L. befindlichen Wuchsorten.
- 2) Der quantitative Gehalt an ätherischem Öl beträgt für die Wurzeldroge nach halbstündiger Wasserdampfdestillation 0,009 % und steigt kontinuierlich bis zur sechsten Stunde auf 0,021 % an. Die Krautdroge liefert nach einer Wasserdampfdestillation von sechs Stunden 0,028 % ätherisches Öl.
- 3) Die ätherischen Öle der Wurzel und des Krautes haben unterschiedliche physikalische und chemische Kennzahlen: Spezifische Drehung: Wurzel + 6,2, Kraut + 3,4; Brechungsindex n_D^{50} : Wurzel 1,4750, Kraut 1,4521; Schmelzpunkt: Wurzel 35–38°C, Kraut 45–48°C; Säurezahl: Wurzel 100, Kraut 158; Jodzahl: Wurzel 90, Kraut 61; Verseifungszahl: Wurzel 114, Kraut 163; Dichte (bei 60°C): Wurzel 0,893, Kraut 0,849; UV-Spektrum: Wurzel $\lambda_{\max}$ 229 und 258 nm, Schultern bei 251 und 270 nm, Kraut Schultern bei 231 und 280 nm.
- 4) Die quantitative Auftrennung der ätherischen Öle (gewonnen durch sechsstündige Destillationsdauer) nach Verbindungsklassen ergibt für die Wurzeldroge 51 % freie Fettsäuren, 22 % Kohlenwasserstoffe, 1 % Carbonylverbindungen (mit Girard D-Reagenz abtrennbar), 6–7 % primäre Alkohole, 3 % Säurekomponente der Ester, 2–3 % Phenolkomponente der Ester, 3–4 % Carbonylverbindungen (mit Girard D-Reagenz nicht abtrennbar) und Phenoläther sowie 3 % Alkohole. Das ätherische Krautöl setzt sich aus 75 % freien Fettsäuren, 6 % Kohlenwasserstoffen und 19 % ätherischem Restöl zusammen.
- 5) Die Fraktionen der Fettsäuren der durch sechsstündige Wasserdampfdestillation hergestellten ätherischen Öle enthalten die homologe Reihe der gesättigten n-Fettsäuren von C_6 (Wurzel) bzw. C_7 (Kraut) bis C_{18} sowie die ungesättigten Fettsäuren Palmitolein-, Öl-, Linol- und Linolensäure (Wurzel: 33 %, Kraut: 32 %). Palmitinsäure ist

in den Fettsäurefraktionen beider ätherischen Öle zu jeweils 48 % enthalten.

Das in der Literatur als Hauptinhaltsstoff des ätherischen Wurzelöles genannte Spinosin konnte unter den hier vorliegenden Untersuchungsbedingungen nicht nachgewiesen werden.

6) Durch GC-massenspektroskopische Untersuchungen werden im ätherischen Öl der Wurzeln folgende bislang in *Ononis spinosa* L. unbekannte Substanzen identifiziert: Menthon, Isomenthon, Campher, Linalool, Menthol, Estragol, Borneol, Carvon, cis-Anethol und trans-Anethol.

Für Anethol, das nach Abtrennen der Fettsäurefraktion die Hauptkomponente des ätherischen Wurzelöles darstellt, wird ein Gehalt von 0,7 % des ätherischen Gesamtöles ermittelt.

Im ätherischen Öl der Krautdroge ist keine dieser Substanzen enthalten; dafür können hier Palmitinsäuremethyl- und Palmitinsäureäthylester sowie nach Verseifen α -Terpineol als weitere bislang in der Droge und ihrem ätherischen Öl unbekannte Substanzen identifiziert werden.

7) Im ätherischen Öl der Wurzeldroge kommen ferner Naphthalin, 1-Methylnaphthalin, 2-Methylnaphthalin, Dimethylnaphthalin, Trimethylnaphthalin, Diphenyl, Fluoren, Stilben, Hexachlorcyclohexan (Gammexan), Phenanthren und Fluoranthren, im ätherischen Öl der Krautdroge 1-Methylnaphthalin, 2-Methylnaphthalin, Dimethylnaphthalin, Trimethylnaphthalin, Diphenyl, Acenaphthen, Fluoren, Stilben, Phenanthren, Fluoranthren sowie Pyren vor. Diese in der Droge und ihrem ätherischen Öl bislang nicht beschriebenen Verbindungen müssen mit Ausnahme von Stilben, Naphthalin, Methyl- sowie Dimethylnaphthalin als aus der Umwelt aufgenommene Verunreinigungen angesprochen werden. Durch quantitative Bestimmung wird für die vom Balkan bezogene Wurzeldroge ein Gehalt von 0,4 ppm an Gammexan ermittelt, was einem Wert von 0,04 ppm für den Infus der Droge entspricht. Die sich hieraus im Hinblick auf die Lebensmittelgesetzgebung ergebende Problematik wird diskutiert.

8) Die pharmakologischen Untersuchungen zeigen, daß die ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut der Droge eine vermehrte Harnausscheidung hervorrufen. Eine signifikante Diuresesteigerung wird bei der Wurzel nur für das durch vierstündige Wasserdampfdestillation gewonnene ätherische Öl nach Gaben von 1,0 mg pro Tier sowie für das

nach zweistündiger Destillation abgeschiedene ätherische Öl nach Gaben von 0,5 mg pro Tier, beim Kraut für das durch sechsstündige Destillation erhaltene ätherische Öl nach Gaben von 0,5 mg pro Tier nachgewiesen.

9) Als Maß für den diuretischen Effekt der ätherischen Öle werden Theophyllinnatrium-salicylat-Lösungen unter gleichen Bedingungen wie die ätherischen Öle geprüft. Einzelgaben von 20 mg dieser Substanz bewirken eine signifikant gesteigerte Harnausscheidung, die der von 0,5 mg des durch zweistündige Wasserdampfdestillation gewonnenen ätherischen Wurzelöles annähernd entspricht. Gaben von 10 bzw. 40 mg Theophyllinnatriumsalicylat pro Tier rufen keine signifikant vermehrte Harnausscheidung hervor.

Durch Prüfung verschiedener Fraktionen sowie ätherischen Restöles wird deutlich, daß das ätherische Gesamtöl bzw. mehrere in verschiedenen Fraktionen und im ätherischen Restöl lokalisierte Substanzen für die diuretische Wirksamkeit verantwortlich sind.

10) Infuse und Dekokte der Droge zeigen mit Ausnahme der Infuse der Wurzel Droge, die eine geringe prozentuale Diuresesteigerung hervorrufen, eine prozentual verminderte Harnausscheidung. Auch die wäßrigen Rückstände der Wasserdampfdestillationen der Wurzel Droge verursachen eine prozentuale Diuresehemmung, die mit zunehmender Destillationsdauer stärker wird.

Auf Grund der Ergebnisse sind allein die ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut diuretisch wirksam. Das Vorhandensein eines wasserlöslichen, diuresehemmenden Wirkstoffes wird diskutiert.

B. Experimenteller Teil

I. Phytochemische Untersuchungen

1. Untersuchte Pflanzen und Ernte des Materials

Untersucht wurden die ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut von *Ononis spinosa* L. (Angaben über Herkunft und Kultur der Pflanze siehe S. 3).

Die krautigen Teile sowie die zu vergleichenden Untersuchungen benötigten Wurzeln wurden jeweils in den Vormittagsstunden geerntet. Die Wurzeln wurden sorgfältig gewaschen und wie das Kraut in luftigen Räumen vorgetrocknet, im Umlufttrockenschrank (Heraeus, Typ TU 1) bei 40-45°C nachgetrocknet, geschnitten und in der Schlag-Drogenmühle AEG, Typ AM 80 N₂ (Sieb 1,5) gemahlen. Bis zur Durchführung der Wasserdampfdestillation wurde die Droge in Glas- bzw. Plastikgefäßen an einem trockenen, kühlen und vor Licht geschützten Ort aufbewahrt.

Größere Mengen Wurzeldroge wurden geschnitten (0,5 mm Schnitt, Größe 100-200 µ) durch den Drogenhandel, Fa. Caesar und Loretz, vom Balkan bezogen.

Insgesamt wurden für die beschriebenen Untersuchungen 70 kg Wurzeldroge und 17 kg Krautdroge verwendet.

2. Allgemeine Methoden zur Analyse der ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut der Droge

a) Quantitative Bestimmung

Die quantitative Bestimmung der ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut der dornigen Hauhechel wurde mit Hilfe der "Karlsruher Apparatur" nach E. Stahl (Fa. Bender und Hobein GmbH, München) durchgeführt. Dabei wurden je 20 g der fein zerkleinerten Droge in einem 500 ml-Schliffkolben der "Karlsruher Apparatur" mit 200 ml Wasser übergossen und bei einer Destillationsgeschwindigkeit von 2,5 ml/min in eine Pentanvorlage destilliert. Die Destillationsdauer der Wurzeldroge betrug 0,5, 1, 2, 4 und 6 Stunden; die Krautdroge wurde ausschließlich 6 Stunden der Wasserdampfdestillation unterzogen. Um unerwünschtes Schäumen während der Destillation zu vermeiden, wurden zu einem Teil der Ansätze jeweils 3 ccm einer Silikon-Antischaumemulsion M-30 (Fa. Serva, Heidelberg) in einer Konzentration von 1:10000

zugefügt. Die Pentan-Vorlage wurde nach beendeter Destillation wasserfrei in ein Mikrokölbchen überführt, die Apparatur (Kühler, Meßkapillare und Ablauf) mit 5 ml Pentan sorgfältig gespült und dieses mit dem Vorgelegten vereinigt. Durch Abdampfen im Trockenschrank bei 40°C wurde das Pentan schonend entfernt und die Mikrokölbchen im Vakuumexsikkator über Blaugel (Fa. Merck) bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Alle angegebenen Analysenzahlen sind Mittelwerte aus mindestens 3 Parallelbestimmungen.

Zur Gewinnung größerer Mengen ätherischen Öles wurden 200 g Droge unter Zusatz von 2 l Wasser in einem 6 l-Kolben der Wasserdampfdestillation unterworfen.

b) Bestimmung chemischer Kennzahlen (siehe W. Rinn, 1970)

Die Vorschrift des DAB 7 wurde zur Bestimmung der Säurezahl kleiner Ölmengen folgendermaßen abgewandelt: 40-50 mg ätherisches Öl wurden genau in einen 50 ml-Erlenmeyerkolben eingewogen, mit 30 ml einer zuvor gegen Phenolphthalein neutralisierten Mischung gleicher Teile Äther und Alkohol (96 %ig) versetzt und mit 0,02 N äthanolischer Natronlauge aus einer 1 ml-Bürette bis zum Farbumschlag nach rosa titriert:

$$\text{Säurezahl} = \frac{a \cdot 5,61}{5 \cdot e}$$

(a = ml Verbrauch an 0,02 N Natronlauge, e = Einwaage in g).

Die Bestimmung der Jodzahl wurde nach Vorschrift des DAB 7 durchgeführt: 50-70 mg ätherisches Öl wurden genau in einen 100 ml-Schliffkolben eingewogen, in 10,0 ml Chloroform gelöst und mit 10,00 ml 0,2 N methanolischer Bromlösung versetzt. Nach kurzem Umschwenken wurde der Ansatz 2 Stunden im Dunkeln stehen gelassen, anschließend mit 15,0 ml 10 %iger Kaliumjodidlösung versetzt und das ausgeschiedene Jod mit einer 0,1 N Natriumthiosulfatlösung unter Zusatz von Stärke titriert. Zu jeder Versuchsreihe wurde unter gleichen Bedingungen ein Blindversuch durchgeführt:

$$\text{Jodzahl} = \frac{(b - a) \cdot 1,269}{e}$$

(a = ml Verbrauch an 0,1 N Natriumthiosulfatlösung im Hauptversuch, b = ml Verbrauch an 0,1 N Natriumthiosulfatlösung im Blindversuch, e = Einwaage in g).

Die Verseifungszahl wurde nach einer für kleine Ölmengen abgewandelten Vorschrift des DAB 7 bestimmt: 50-100 mg ätherisches Öl wurden genau in einen 30 ml-Spitzkolben eingewogen, mit 10,00 ml 0,1 N äthanolischer Kalilauge versetzt und unter Rückfluß 2 Stunden lang auf dem Wasserbad erhitzt. Anschließend wurde die heiße Lösung mit 0,1 N Salzsäure gegen Phenolphthalein titriert. Zu jeder Versuchsreihe wurde unter gleichen Bedingungen ein Blindwert ermittelt:

$$\text{Verseifungszahl} = \frac{(b - a) \cdot 28,05}{5 \cdot e}$$

(a = ml Verbrauch an 0,1 N Salzsäure im Hauptversuch, b = ml Verbrauch an 0,1 N Salzsäure im Blindversuch, e = Einwaage in g).

c) Bestimmung physikalischer Kennzahlen

Das optische Drehvermögen wurde mit dem Kreispolarimeter 0,01° (Fa. Zeiss, Oberkochen/Württ.) bei 20°C gemessen. Zur Bestimmung der spezifischen Drehung wurden 100 mg Öl mit Benzol zu 5,00 ml gelöst.- Die Refraktion wurde mit dem Abbe-Refraktometer (Fa. Zeiss, Oberkochen/Württ.) bei 50°C ermittelt.- Der Schmelzpunkt wurde mit dem Mikroheiztisch 350 (Fa. Leitz, Wetzlar) bestimmt.- Die Dichtemessung erfolgte mit einem Pyknometer von 1 ml Inhalt analog der Vorschrift des DAB 7 bei einer Temperatur von 60°C.

d) Spektroskopische Methoden

Die Ultraviolett-Spektren wurden mit dem Zeiss - Spektralphotometer PMQ II in Methanol p.a. aufgenommen.

Dabei wurden 1,6 mg des ätherischen Wurzelöles, 5 mg des ätherischen Krautöles bzw. 0,25 mg trans-Anethol mit Methanol p.a. zu 50 ml gelöst.

Die Aufnahme der Infrarot-Spektren erfolgte mit dem Gerät 257 der Fa. Perkin-Elmer. Die ätherischen Wurzel- und Krautöle wurden als dünner Film zwischen NaCl-Plättchen, die Palmitinsäure als KBr-Preßling aufgenommen.

Die Kernmagnetischen Resonanzspektren stellten wir mit Hilfe des NMR-Spektrometers T-60 der Fa. Varian Associates unter Verwendung von Tetrachlorkohlenstoff als Lösungsmittel her.

Zur Aufnahme der gekoppelten Gaschromatogramme und Massenspektren siehe S.124.

e) Chromatographische Untersuchungen

Die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen wurden auf Kieselgel HF₂₅₄ - Platten (20 : 20 cm und 10 : 20 cm; Schichtdicke 250 μ) durchgeführt. Von den Fließmitteln a) Petroläther (40-60^oC) / Äther (90 : 10), b) n-Hexan / Eisessig / Äthylacetat (85 : 10 : 5) und c) Benzol p.a. erwies sich letzteres zur Auftrennung der ätherischen Gesamtöle von Wurzel und Kraut der Droge als am besten geeignet. Nach dem Entwickeln wurden alle Chromatogramme unter der UV-Lampe, nach Einstellen in eine Jodkammer sowie nach Besprühen mit Vanillin-Schwefelsäure und anschließendem Erhitzen auf 120^oC betrachtet und markiert.

Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel (0,05 - 0,2 mm) bzw. Kieselgel H (Fa. Merck) verwendet.

Die analytische Gaschromatographie wurde mit Hilfe des Perkin-Elmer Gaschromatographen Fraktometer F 7 mit Flammenionisationsdetektor und Hitachi - Perkin-Elmer Flachpult-Kompensationsschreiber Typ 159 durchgeführt. Die Analysen wurden mit Ausnahme der Untersuchung der Fettsäuren (Arbeitsbedingungen siehe S.118) unter folgenden Bedingungen durchgeführt :

Säule : Makro-Golaysäule, Perkin-Elmer Typ 4 G 3;

Länge 100 m; innerer Durchmesser 1 mm;

stationäre

Phase : Polypropylenglykol;

Temperatur : isotherm bei 150^oC;

Trägergas : Stickstoff; Strömungsgeschwindigkeit 25 ml/min;

Temperatur des

Einspritzblocks : 280^oC;

Temperatur des

Detektors : 300^oC;

Einspritzmenge : ca. 0,1 μ l;

Papiervorschub : 10 mm/min.

3. Halbquantitative Bestimmungen der durch unterschiedliche Destillationszeiten gewonnenen ätherischen Öle aus den Wurzeln der Droge

Zur halbquantitativen Bestimmung der durch unterschiedliche Destillationszeiten gewonnenen ätherischen Öle wurde die vom Balkan stammende Wurzeldroge verwendet. Die Destillationsdauer betrug 0,5, 1, 2, 4 und 6 Stunden. Von den gleich konzentrierten Lösungen (1 %ig) dieser ätherischen Öle in Benzol p.a. wurden gleiche Mengen (30 μ l) auf Kieselgel HF₂₅₄-Platten (20 : 20 cm; Schichtdicke 250 μ) aufgetragen und in Benzol p.a. aufgetrennt. Nach dem Entwickeln der Platten wurden die Chromatogramme unter der UV-Lampe, durch Einstellen in eine Jodkammer sowie nach Besprühen mit Vanillin-Schwefelsäure und Erhitzen auf 120°C ausgewertet. Die so erhaltenen Flecken wurden visuell durch Vergleich ihrer Größe und Farbtintensität halbquantitativ bestimmt.

4. Auftrennung der ätherischen Wurzel- und Krautöle nach Verbindungsklassen

a) Analyse der Fettsäurerefraktion

Abtrennung und Dünnschichtchromatographie der Fettsäurerefraktion

Zur Abtrennung der Fettsäuren wurden ca. 1 g ätherisches Öl der Kraut- bzw. Wurzel droge in 200 ml Pentan gelöst und die Lösung achtmal mit jeweils 100 ml 5 %iger Natriumcarbonatlösung und anschließend viermal mit je 100 ml Wasser ausgeschüttelt. Die sich hierbei reichlich bildenden Natriumsalze höherer Fettsäuren wurden in die wäßrige Phase überführt. Nach dem Ansäuern der vereinigten wäßrigen Auszüge mit verdünnter Salzsäure wurde mehrmals mit Äther extrahiert und der über Na₂SO₄ sicc. getrocknete Äther im Vakuum abgedampft.

Die so erhaltenen Fettsäuren wurden zur ersten Orientierung mit Vergleichssubstanzen auf Kieselgel H -Platten in dem System Chloroform / Äthylacetat / Ameisensäure (90 : 10 : 2 ; v : v : v) über eine Laufstrecke von 15 cm chromatographiert. Die Laufzeit betrug ca. 50 Minuten; der Fluoreszenzindikator Pyranin [3-Hydroxypyren-5,8,10-trisulfonsaures Natrium; Fa. Bayer, Leverkusen (siehe K.D. Rehm, 1967)] diente zum Nachweis der Fettsäuren. Im UV-Licht fluoreszierten die Fettsäuren hellblau (360 nm) auf grüngelbem Untergrund. Die Nachweisgrenze lag bei 1 μ g.

Der Nachweis eventuell ausgeschüttelter Phenole wurde durch Besprühen der Dünnschichtplatten mit einer frisch bereiteten 0,5 %igen Echtblausalz B-Lösung und durch Nachbehandeln mit einer 0,1 N Natronlauge geführt.

Es wurden zur Fertigstellung von 5 Kieselgel H-Platten (20 x 20 cm) 30 g Kieselgel H (Fa. Merck) mit einer Lösung von 10 mg Pyranin in 60 ml Wasser angerührt und diese Suspension mit einem Streichgerät für Dünnschichtplatten in einer Schichtdicke von 250 μ aufgetragen. Die Platten wurden bei 120^o C aktiviert.

Methylierung, Reinigung und Dünnschichtchromatographie der Fettsäuremethylester

Zur Methylierung wurden die Fettsäuren in wenig Äther gelöst und bis zur beständigen Gelbfärbung mit ätherischer Diazomethanlösung versetzt. Dieser Ansatz wurde nach Stehen über Nacht im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft.

Die ätherische Diazomethanlösung wurde dargestellt, indem 2 g N-Nitroso-toluol-4-sulfomethylamid (Fa. Fluka) in 30 ml Äther gegeben, mit Eis-Kochsalz-Mischung auf - 15^o C abgekühlt und unter Rühren tropfenweise mit 20 ml 0,5 N äthanolischer Kalilauge versetzt wurden. Nach Destillation dieses Ansatzes in eine mit wenig Äther beschickte Vorlage wurde die ätherische Diazomethanlösung bis zum Verbrauch im Tiefkühlschrank aufbewahrt.

Die Fettsäuremethylester (FS-ME) wurden auf Kieselgel H-Platten, die mit Pyranin imprägniert waren, in dem System Petroläther (40-60^o C) / Äther (70 : 30 ; v : v) chromatographiert (K.D. Rehm, 1967; siehe auch E. Viogue und R.T. Holman , 1962), wobei die Laufhöhe 15 cm und die Laufzeit ca. 45 Minuten betrug. In diesem Fließmittel zeigten gesättigte und ungesättigte FS-ME den gleichen R_F -Wert (0,8), während Begleitstoffe im UV-Licht (360 nm) als dunkle Flecken erschienen.

Durch präparative Dickschichtchromatographie wurden die Begleitsubstanzen des FS-ME-Gemisches nach der Vorschrift von K.D. Rehm (1967) in dem für die DC der FS-ME angegebenen System abgetrennt.

Zur Fertigstellung einer mit Pyranin imprägnierten Dickschichtplatte (20 x 20 cm) wurden 40 g Kieselgel H mit einer Lösung von 12 mg Pyranin in 80 ml Wasser angerührt und diese so erhaltene Suspension mit einem Streichgerät für Dünnschichtplatten in einer Schichtdicke von 1 mm aufgetragen. Nach Trocknen an der Luft (ca. 24 h)

wurden die Platten 2 Stunden bei 120°C aktiviert. Dann wurden ca. 200 mg der in wenig Chloroform gelösten FS-ME strichförmig auf die Startlinie jeder Platte aufgetragen. Nach der Laufzeit von ca. 45 Minuten und einer Laufhöhe von 15 cm wurde die unter dem UV-Licht hellblau fluoreszierende Zone der FS-ME markiert, das Adsorbens von der Platte abgekratzt und viermal mit der zehnfachen Menge Chloroform extrahiert.

Nach Eindampfen der Chloroformlösung im Vakuum bei Zimmertemperatur wurden die Gesamt-FS-ME gaschromatographisch untersucht.

Fraktionierung in gesättigte und ungesättigte Fettsäuremethylester

Nach E. Jantzen und H. Andreas (1960) wurden die ungesättigten FS-ME in Hg (II)-acetat-Addukte überführt und so von den nicht reagierenden gesättigten FS-ME durch präparative Dünnschichtchromatographie abgetrennt: 50 mg FS-ME wurden in einer Mischung von 1,4 g Hg (II)-acetat, 25 ml Methanol, 0,25 ml Wasser und 0,1 ml Eisessig gelöst und 48 Stunden im Dunkeln stengelassen. Nach Eindampfen dieses Ansatzes im Vakuum bei Zimmertemperatur wurde der Rückstand in 15 ml Chloroform suspendiert und fünfmal mit je 10 ml Wasser zur Entfernung des überschüssigen Hg (II)-acetats gewaschen. Die Chloroformlösung wurde über Na_2SO_4 sicc. getrocknet und im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft.

Für die Trennung der gesättigten FS-ME von den Hg (II)-acetat-Addukten der ungesättigten FS-ME wurde eine Mischung von 3 Teilen Kieselgel H und 7 Teilen Kieselgur G (H. Wagner und P. Pohl, 1964) als Adsorbens verwendet. Als Fließmittel diente nach H. K. Mangold und R. Kammereck (1961) Petroläther ($60-80^{\circ}\text{C}$) / Äther (80 : 20; v : v). Auf jede Platte wurden ca. 20 mg des in Chloroform gelösten Gemisches strichförmig auf die Startlinie aufgetragen. Nach einer Laufzeit von ca. 45 Minuten und einer Laufstrecke von 15 cm lagen die gesättigten FS-ME in diesem System unter der Laufmittelfront ($R_f = 0,9$) und erschienen in einer Jodkammer als braunes Band, während die Hg (II)-acetat-Addukte der ungesättigten FS-ME an der Startlinie liegenblieben und durch Besprühen mit einer 0,1 %igen äthanolischen Dithizonlösung als rosafarbenes Band sichtbar gemacht wurden. Die markierten Zonen wurden von der Platte abgekratzt und mit Chloroform die Fraktion der gesättigten FS-ME aus dem Adsorbens extrahiert.

Durch die Adduktspaltung nach A. Glaser u. Mitarb. (1962) wurde die Fraktion der ungesättigten FS-ME aus der Zone der Hg (II)-acetat-Addukte ohne vorherige Abtrennung des Adsorbens zurückgewonnen. Für 100 mg Addukte wurden 6 ml einer Lösung von 5 % Ammoniumthiocyanat in Methanol und 0,8 ml Salzsäure (37 %ig) dem von den Platten abgeschabten Adsorbens zugesetzt und diese Mischung eine Stunde lang im Dunkeln unter häufigem Umschwenken stehengelassen. Danach wurde der Ansatz mit 30 ml Wasser verdünnt, dreimal mit je 10 ml Petroläther (40-60°C) ausgeschüttelt und die vereinigten Petrolätherphasen über Na_2SO_4 sicc. getrocknet und im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft.

Die Fraktion der ungesättigten FS-ME wurde gaschromatographisch, die der gesättigten FS-ME gas- und dünnsschichtchromatographisch untersucht.

Dünnsschichtchromatographische Trennung der ungesättigten Fettsäuremethylester

Nach der Methode von H.K. Mangold und R. Kammereck (1961) wurde das Gemisch der gesättigten FS-ME und der Hg (II)-acetat-Addukte der ungesättigten FS-ME auf Kieselgel H- Kieselgur G -Platten (3 : 7) aufgetrennt. Dabei wurde über eine Laufstrecke von 16 - 18 cm in dem Laufmittelgemisch Petroläther (60-80°C) / Äther (80 : 20; v : v) chromatographiert. Anschließend wurden die am Start lieengebliebenen Addukte in dem Laufmittel n-Propanol / Eisessig (100 : 1; v : v) in der gleichen Richtung über eine Laufstrecke von 12 - 14 cm während 3 bis 4 Stunden aufgetrennt. Nach Anzahl der Doppelbindungen der jeweiligen Fettsäuren zeigten die Addukte der ungesättigten FS-ME unterschiedliche R_f -Werte, was durch Besprühen mit einer 0,1 %igen Dithizonlösung in 96 %igem Alkohol als rosafarbenes Band sichtbar gemacht wurde.

Das Gemisch der gesättigten FS-ME und der Hg (II)-acetat-Addukte der ungesättigten FS-ME wurde zur weiteren Identifizierung auf 250 μ dicken Dünnsschichtplatten (Adsorbens: Kieselgel H- Kieselgur G 3 : 7) präparativ nach dem von H.K. Mangold und R. Kammereck (1961) angegebenen Verfahren in die Fraktionen der Monoen-, Dien- und Trien-FS-ME sowie in die Fraktion der gesättigten FS-ME aufgetrennt. Nach Auftragen von 10 bis 15 mg des Gemisches pro Platte wurden die mit Dithizon sichtbar gemachten Adduktzonen von der Platte abgeschabt und die Adduktspaltung

nach A.Glaser u.Mitarb. (1962) ohne vorherige Abtrennung des Adsorbens, wie weiter oben beschrieben, durchgeführt.

Gaschromatographische Trennung der gesättigten und ungesättigten Fettsäuremethylester

Die gaschromatographische Analyse der FS-ME wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Säule: 1 Paar gepackte Stahlsäulen, Perkin-Elmer Typ 42 S 4257, im Kompensationbetrieb; Länge: 2 m; innerer Durchmesser: 3 mm;

stationäre Phase: 2,5 % Äthylenglycolsuccinat auf Chromosorb G (AW-DMCS), 80-100 mesh;

Säulentemperatur: programmiert von 50-180°C, Anstiegsrate 5°C/min, anschließend isotherm bei 180°C;

Trärgas: Stickstoff; Strömungsgeschwindigkeit: 28 ml/min;

Temperatur
des Einspritzblocks: 270°C;

Temperatur
des Detektors: 300°C;

Einspritzmenge: ca. 0,3 µl;

Papiervorschub: 10 mm/min .

Die FS-ME wurden durch Vergleich der relativen Retentionsvolumina, bezogen auf Palmitinsäuremethylester als Standard, mit denen der authentischen FS-ME identifiziert. Der Gehalt der einzelnen Fettsäuren im Gesamtgemisch der FS-ME wurde aus dem Fraktogramm der gereinigten Gesamt-FS-ME nach der Näherungsmethode "Höhenmal Breite in halber Höhe" unter Verwendung des Korrekturfaktors $f = \frac{M}{n \cdot 12}$

nach R.G.Ackmann (1964; siehe auch R.Kaiser, 1965) bestimmt

(M = Molekulargewicht, n = Zahl der verfügbaren C-Atome).

b) Abtrennung der Phenolfraktion

Nach Abtrennen der Fettsäuren wurde die Pentanlösung der ätherischen Öle zur Isolierung der Phenole dreimal mit je 50 ml 5%iger Natronlauge und anschließend zweimal mit je 50 ml Wasser extrahiert. Die vereinigten wäßrigen Ausschüttelungen wurden zwecks Reinigung zweimal mit je 30 ml Petroläther (40-60°C) ausgeschüttelt und nach Ansäuern mit verdünnter Salzsäure fünfmal mit je 30 ml Äther extrahiert. Die so erhaltene Ätherphase wurde über Na_2SO_4 sicc. getrocknet und im Vakuum eingedampft.

Das restliche ätherische Öl wurde nach dem Trocknen der Pentanlösung über Na_2SO_4 sicc. durch Eindampfen im Vakuum bei Zimmertemperatur zurückgewonnen.

Die dünnschichtchromatographische Identifizierung der Phenole erfolgte an Kieselgel HF₂₅₄ (Fa. Merck) mit den Laufmitteln Benzol p.a.; Benzol / Äthylacetat (95 : 5), n-Hexan / Äthylacetat (80 : 20) und Petroläther (60-80°C) / Äther (90 : 10) (E. Schiratz und S. Qedan, 1965). Die Laufhöhe betrug 15 cm, die Laufzeit 20 - 40 Minuten. Die Platten wurden zum Nachweis der Phenole mit einer frisch bereiteten 0,5 %-igen Echtblausalz B-Lösung besprüht und mit 0,1 N Natronlauge nachbehandelt.

c) Abtrennung der Kohlenwasserstoff-Fraktion

Isolierung der Kohlenwasserstoffe und Fraktionierung in Terpen- und Paraffin-Kohlenwasserstoffe

Das von freien Fettsäuren und Phenolen befreite ätherische Öl (ca. 0,5 g ätherisches Wurzelrestöl und ca. 0,25 g ätherisches Krautrestöl) wurde zur Isolierung der Kohlenwasserstoff-Fraktion an einer wassergekühlten Kieselgel H-Säule (250 x 30 mm) chromatographiert. Durch Eluieren mit 600-800 ml Petroläther (40-60°C) und Eindampfen der Lösung im Vakuum bei Zimmertemperatur wurden die Kohlenwasserstoffe erhalten. Die restlichen Bestandteile der ätherischen Öle wurden durch Eluieren mit 800-1000 ml Äther und Abdampfen des Lösungsmittels im Vakuum zurückgewonnen.

Die Paraffin-Kohlenwasserstoffe wurden durch Bildung der kristallinen Harnstoffaddukte von den aromatischen und den Terpen-Kohlenwasserstoffen abgetrennt (W. Schlenk jr., 1949; F. Wolf, 1960). Dabei wurden 0,25 g der Kohlenwasserstoff-Fraktion mit

1 ml Benzol versetzt und auf 60°C erwärmt. Eine gleichwarme, übersättigte methanolische Harnstofflösung (1,25 g Harnstoff in 2,25 ml Methanol) wurde unter Rühren mit einem Magnetrührer zugesetzt und die Mischung bis zum Erkalten gerührt. Nach vollständiger Kristallisation über Nacht im Kühlschrank wurden die abgeschiedenen Kristalle scharf abgesaugt und mehrmals mit wenig gesättigter methanolischer Harnstofflösung gleicher Temperatur gewaschen.

Die vereinigten Filtrate wurden mit Wasser auf 100 ml verdünnt, mit Kochsalz gesättigt und viermal mit je 30 ml Petroläther ($40-60^{\circ}\text{C}$) ausgeschüttelt. Nach Trocknen der Petrolätherphasen über Na_2SO_4 sicc. wurde im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft.

Die Harnstoffaddukte der Paraffin-Kohlenwasserstoffe wurden durch Eintragen in 100 ml heißes Wasser zerlegt. Nach Sättigen der Emulsion mit Kochsalz wurde dreimal mit je 30 ml Petroläther ($40-60^{\circ}\text{C}$) ausgeschüttelt und die Petrolätherphase über Na_2SO_4 sicc. getrocknet und im Vakuum eingedampft.

d) Abtrennung der Carbonylverbindungen und der primären Alkohole

Die Abtrennung der Carbonylverbindungen wurde mit Hilfe des Girard D-Reagenz (N-Dimethylglycin-hydrazid-hydrochlorid) nach M. Viscontini und J. Meier (1950) durchgeführt. Dabei wurde das nach Abtrennen der Fettsäuren, Phenole und Kohlenwasserstoffe verbliebene ätherische Öl (ca. 0,23 g ätherisches Wurzelrestöl und ca. 0,19 g ätherisches Krautrestöl) mit 10 ml Methanol und 1 g Girard D-Reagenz (Fa. Fluka) versetzt, 24 Stunden bei Zimmertemperatur im Dunkeln stehengelassen und auf dem Wasserbad 2 Stunden im schwachen Stickstoffstrom unter Rückfluß erhitzt. Der Ansatz wurde nach dem Erkalten in 100 ml Eiswasser gegossen. Diese Mischung wurde fünfmal mit je 30 ml Dichlormethan ausgeschüttelt und die so erhaltene organische Phase zweimal mit wenig Wasser gewaschen. Waschwasser und wäßrige Phase wurden zusammengegeben und nochmals mit 30 ml Dichlormethan, das dann verworfen wurde, ausgeschüttelt. Nach Trocknen der Dichlormethanlösung über Na_2SO_4 sicc. wurden die nicht umgesetzten ätherischen Ölbestandteile durch Eindampfen im Vakuum bei Zimmertemperatur zurückgewonnen.

Die wäßrige Phase wurde nach Versetzen mit 70 ml 10 %iger Salzsäure mit 100 ml Dichlormethan unterschichtet und 5 Stunden unter häufigem Umschütteln stehengelassen. Dann wurde die organische Schicht abgetrennt und die wäßrige Lösung dreimal mit je 30 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen der vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 sicc. wurde im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft.

Zur Abtrennung der primären Alkohole wurde das von L. S. Glichitsch und Y. R. Naves (1933) angegebene und von H. F. E. Nufer (1965) für präparative Zwecke modifizierte Phthalesterverfahren angewandt. Dabei wurde das nach Abtrennen der Carbonylverbindungen verbliebene ätherische Restöl (ca. 0,22 g ätherisches Wurzelrestöl) mit einer Lösung von 1,5 g phthalsäurefreiem Phthalsäureanhydrid in 15 ml Pyridin versetzt und 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen. Danach wurde diese Mischung mit 100 ml Äther in einen Scheidetrichter überführt und mit gut gekühlter, verdünnter Schwefelsäure bis zur kongosauren Reaktion versetzt. Nach Abtrennen des Äthers wurde die wäßrige Phase dreimal mit je 50 ml Äther ausgeschüttelt und die vereinigten Ätherphasen im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft. Der Rückstand wurde mit 100 ml warmer 10 %iger Natriumcarbonatlösung behandelt und dreimal mit je 50 ml Petroläther (40-60°C) ausgeschüttelt, um von nicht umgesetztem ätherischem Restöl zu befreien. Die über Na_2SO_4 sicc. getrocknete Petrolätherphase wurde dann im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft.

Die wäßrig-alkalische Lösung wurde nach Ansäuern mit verdünnter Schwefelsäure bis zur kongosauren Reaktion dreimal mit je 50 ml Äther ausgeschüttelt und die mit Wasser gewaschene Ätherphase im Vakuum eingedampft. Der in wenig Methanol gelöste Rückstand wurde zur Verseifung der sauren Phthalester mit 6 ml methanolischer Kalilauge (2 g KOH werden in 1,5 ml Wasser gelöst und mit 12 ml Methanol verdünnt) versetzt. Nach zwölfstündigem Stehen bei Zimmertemperatur und Verdünnen mit 30 ml Wasser wurde diese Mischung dreimal mit je 20 ml Petroläther (40-60°C) ausgeschüttelt. Die mit Wasser gewaschene und über Na_2SO_4 sicc. getrocknete Petrolätherphase wurde im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft.

e) Bestimmung des Estergehaltes und Auftrennung in Säurekomponente und Phenolkomponente des Esters

Nach Abtrennen der primären Alkohole wurde das verbliebene ätherische Restöl (ca. 0,15 g ätherisches Wurzelrestöl) mit 40 ml 0,5 N methanolischer Natronlauge versetzt und 1 Stunde auf dem Wasserbad unter Rückfluß erhitzt. Die Hälfte des Methanols wurde nach dem Abkühlen im Vakuum abgedampft und der Rest mit 100 ml Wasser verdünnt. Nach viermaligem Ausschütteln mit je 30 ml Petroläther (40-60°C) wurden die vereinigten Petrolätherphasen über Na_2SO_4 sicc. getrocknet und im Vakuum bei Zimmertemperatur eingedampft. Der Estergehalt errechnete sich aus der Differenz zwischen der zur Verseifung eingesetzten Ölmenge und dem mit Petroläther ausgeschüttelten Restanteil.

Die wäßrig-alkalische Phase wurde nach dem Ausschütteln der Restbestandteile des ätherischen Öles mit verdünnter Salzsäure schwach angesäuert (pH 5), mit 100 ml Äther überschichtet und durch dreimaliges Ausschütteln der ätherischen Lösung mit je 30 ml 5 % iger Natriumhydrogencarbonatlösung die Säurekomponente der Ester abgetrennt. Nach dem Ansäuern der Bicarbonatlösung mit verdünnter Salzsäure wurde dreimal mit Äther ausgeschüttelt und der über Na_2SO_4 sicc. getrocknete Äther im Vakuum eingedampft.

Die ätherische Lösung wurde zur Isolierung der Phenolkomponenten der Ester dreimal mit je 30 ml 5 %iger Natronlauge ausgeschüttelt und die vereinigten wäßrigen Phasen mit verdünnter Salzsäure angesäuert. Nach dreimaliger Extraktion mit je 30 ml Äther wurde über Na_2SO_4 sicc. getrocknet und im Vakuum abgedampft.

f) Abtrennung der Phenoläther und Carbonylverbindungen *)

Das nach Abtrennen der Ester verbliebene ätherische Restöl (ca. 0,08 g ätherisches Wurzelrestöl) wurde an einer Kieselgel H-Säule (250 x 30 mm) chromatographiert. Dabei wurde mit 800 ml Benzol erschöpfend eluiert und durch Eindampfen der Lösung im Vakuum die Fraktion der Phenoläther und Carbonylverbindungen gewonnen. Durch Eluieren mit 800 ml Äther und Abdampfen des Lösungsmittels im Vakuum wurden die auf der Säule verbliebenen Alkohole zurückgewonnen.

*) Carbonylverbindungen, die mit Girard D-Reagenz nicht abgetrennt werden können (siehe hierzu W. Rinn, 1970, S.88, Anmerkung 9).

5. Gewinnung geeigneter Fraktionen der ätherischen Öle für die
GC-massenspektroskopischen Untersuchungen

Zur Verwendung gelangten die durch sechsstündige Wasserdampfdestillation gewonnenen ätherischen Öle der vom Balkan stammenden Wurzeldroge sowie der in Marburg a.d. Lahn kultivierten Krautdroge.

Je 1 g des ätherischen Öles wurde zur Abtrennung der Fettsäuren in 100 ml Pentan gelöst und fünfmal mit 100 ml 5 %iger NaHCO_3 -Lösung sowie anschließend dreimal mit 100 ml Wasser ausgeschüttelt.

Die so von Fettsäuren befreite Pentanlösung extrahierten wir dreimal mit 50 ml 5 %iger NaOH sowie dreimal mit 50 ml Wasser, um die in Spuren vorhandenen Phenole zu entfernen.

Danach wurde dreimal mit 25 ml 1 N H_2SO_4 ausgeschüttelt, wobei evtl. vorhandene basische Anteile abgetrennt werden sollten. Nach Waschen mit Wasser bis zur Neutralität und anschließendem Trocknen der Pentanlösung über Na_2SO_4 sicc. gewannen wir das restliche ätherische Öl durch Eindampfen im Vakuum zurück.

Die Abtrennung der Kohlenwasserstoffe erfolgte durch Chromatographie der von Fettsäuren, Phenolen sowie basischen Anteilen befreiten ätherischen Öle an einer Kieselgel H-Säule (250 x 30 mm), wobei zuerst die Kohlenwasserstoffe mit 500 ml Petroläther (40-60°C), dann die restlichen Bestandteile der ätherischen Öle mit 500 ml Äther eluiert wurden. Durch Eindampfen der Petrolätherphase im Vakuum bei Zimmertemperatur wurden die Kohlenwasserstoffe, durch Abdampfen der Ätherphase die restlichen Bestandteile der ätherischen Öle zurückgewonnen.

Das so erhaltene ätherische Restöl der Krautdroge wurde weiter verseift, wobei 0,5 g in ein 20 ml-Spitzkölbchen überführt und nach Zugabe von 20 ml 0,5 N methanolischer Kalilauge eine Stunde im Wasserbad am Rückfluß erhitzt wurden. Danach wurde das Methanol über eine Vigreux-Kolonne bis fast zur Trockne abdestilliert. Der verbleibende Rückstand wurde mit 50 ml Wasser versetzt und viermal mit je 30 ml Pentan ausgeschüttelt.

Nach Waschen der Pentanlösung mit Wasser bis zur Neutralität sowie Trocknen über Na_2SO_4 sicc. wurde das restliche ätherische Krautöl durch Eindampfen im Vakuum bei Zimmertemperatur zurückgewonnen.

Alle ätherischen Restöle sowie die Fraktionen der Kohlenwasserstoffe wurden im Kugelrohr (Houben-Weyl, 1959) bei 0,2 Torr destilliert. Dabei gingen bei unserem ätherischen Wurzelöl zwischen 70 und 80°C (Luftbadtemperatur) eine farblose und zwischen 110 und 150°C eine hellgelbe Fraktion über. Zurück blieb ein bis 230°C nicht destillierbarer Rückstand.

Beim ätherischen Krautöl gewannen wir zwischen 100 und 110°C (Luftbadtemperatur) eine hellgelbe Fraktion. Ein verbleibender Rückstand konnte auch durch Erhitzen bis 230°C nicht übergetrieben werden.

Die Kohlenwasserstoffe des ätherischen Wurzelöles gingen zwischen 95 und 105°C (Luftbadtemperatur), die des ätherischen Krautöles zwischen 100 und 110°C (Luftbadtemperatur) über.

Die durch Verseifen des ätherischen Restöles der untersuchten Krautdroge erhaltene Fraktion wurde im Kugelrohr bei 0,8 Torr destilliert, wobei diese als farbloses Öl zwischen 130 und 210°C (Luftbadtemperatur) überging.

6. Bedingungen der GC-massenspektroskopischen Untersuchungen

Zur direkten Kopplung von Gaschromatographie und Massenspektrometrie diente das Gerät 111 der Fa. Varian MAT, Bremen. Als Trägergas für die Gaschromatographie wurde Helium verwendet. Die Siedefractionen der ätherischen Restöle aus Wurzel und Kraut der Droge wurden gaschromatographisch mit Hilfe einer 4 m langen, 1/8 Zoll starken Stahlsäule, gefüllt mit 0,5 % Carbowax® 20 M auf Chromosorb® G-AW-DMCS 80/100 mesh untersucht. Bei der Gaschromatographie wurden folgende Säulentemperaturen gewählt:

- a) Siedefraktion des ätherischen Restöles der Wurzeldroge: 80°C isotherm;
- b) Siedefraktion des ätherischen Restöles der Krautdroge: 75°C isotherm während 18,5 Minuten, weiter programmiert mit einer Anstiegsrate von 4°C/Minute bis 150°C, bei dieser Temperatur 8 Minuten isotherm;
- c) Siedefraktion des ätherischen Restöles der Krautdroge nach Verseifen: 75°C isotherm während 19,5 Minuten, weiter programmiert mit einer Anstiegsrate von 4°C/Minute bis 150°C, bei dieser Temperatur 5 Minuten isotherm.

Zur Gaschromatographie der aromatischen Kohlenwasserstoffe aus Wurzel und Kraut der Droge fand eine 4 m lange, 1/8 Zoll starke Stahlsäule, gefüllt mit 2,5 % SE 52 auf Chromosorb[®] G-AW-DMCS 80/100 mesh Verwendung. Folgende Säulentemperaturen wurden gewählt:

- a) Kohlenwasserstoffe der Wurzeldroge: 130°C isotherm während 37 Minuten, weiter programmiert mit einer Anstiegsrate von 4°C/Minute bis 250°C;
- b) Kohlenwasserstoffe der Krautdroge: 130°C isotherm während 37 Minuten, weiter programmiert mit einer Anstiegsrate von 4°C/Minute bis 250°C, bei dieser Temperatur 15 Minuten isotherm.

Alle Substanzen wurden über einen Helium-Spaltseparator in das Massenspektrometer geleitet. Zur Korrektur der Totalionenstromänderung während der Aufnahme der Massenspektren diente das Datensystem SS 100 der oben genannten Firma. Hiermit erfolgte auch die Subtraktion des Untergrundes, der durch Bluten der Trennsäule verursacht wurde.

7. Quantitative Bestimmung von Anethol und Gammexan

Die quantitative Bestimmung von Anethol und Gammexan wurde gaschromatographisch nach der Methode des inneren Standards (H. Farnow, ohne Jahr) unter Eichung mit probeneigener Substanz durchgeführt. Dabei wurde Anethol in dem von Fettsäuren befreiten ätherischen Wurzelöl (siehe S. 114) mit Hilfe des Perkin-Elmer Gaschromatograph Fraktometer F 7 (Bedingungen siehe S. 113), Gammexan in der Kohlenwasserstoff-Fraktion des ätherischen Wurzelöles (siehe S. 123) unter Verwendung des Gerätes 111 der Fa. Varian MAT, Bremen (Bedingungen siehe S. 124) bestimmt. Zur Verwendung gelangte das durch sechsstündige Wasserdampfdestillation gewonnene ätherische Öl der vom Balkan stammenden Wurzeldroge.

Die Bestimmung wurde derart durchgeführt, daß aus dem Gaschromatogramm des jeweiligen Analysengemisches die Flächen der zu bestimmenden und einer weiteren, beliebigen Substanz durch Höhe mal Halbwertsbreite ihrer Signale ermittelt wurden. Auf gleiche Weise wurden die Flächen der beiden oben angesprochenen Substanzen für eine genau abgewogene Menge des Gemisches nach Zusatz eines bestimmten Anteils an

Reinsubstanz der quantitativ zu erfassenden Komponente errechnet. Der Prozentgehalt der zugesetzten Substanz ergab sich aus den Gewichtsverhältnissen. Der Gehalt der zu bestimmenden Verbindung konnte an Hand der so gewonnenen Daten nach folgender Formel bestimmt werden:

$$\text{Gew. \% a} = \frac{100 \cdot F_a \cdot Z}{\left(\frac{F_x \text{ ohne } Z}{F_x \text{ mit } Z} \cdot F_{a+z} - F_a \right) (100 - Z)}$$

F_a = Flächenwert der Substanz a ohne Zusatz (Anethol bzw. Gammexan),

F_{a+z} = Flächenwert der Substanz a nach Zusatz (Anethol bzw. Gammexan)
einer genau gewogenen Menge der Substanz a ,

F_x = Flächenwert einer beliebigen, unbeeinflussten Bande ohne bzw. nach Zusatz
von a (Carvon bzw. Phenanthren),

Z = Gew. % Zusatz im neuen Gemisch (=100).

II. Pharmakologische Untersuchungen

1. Verwendetes Tiermaterial

Für unsere Untersuchungen wurden 120 männliche Albinoratten, Stamm Wistar, Lieferant Ivanovas, Kisslegg, und 30 männliche Tiere des Stammes Han. Wistar "SPF" des Zentralinstitutes für Versuchstierzucht in Hannover verwendet. Insgesamt wurden in 63 Versuchsreihen 1603 Einzelversuche durchgeführt. Das mittlere Lebendgewicht der Tiere lag bei 247 g; die Tiere wurden mit einem Gewicht von 100-400 g in Versuch genommen.

In der Regel arbeiteten wir mit zwei, selten mit drei Tiergruppen, die nach Alter und Gewicht zusammengestellt waren. Zwischen den einzelnen Versuchen erhielten die Tiere eine Ruhepause von mindestens fünf Tagen. Jedes Tier wurde maximal zu höchstens zwölf Versuchen herangezogen, davon in der Regel zur Hälfte zu Kontroll- und zur Hälfte zu Drogenversuchen.

Außerhalb der Versuche wurden die Tiere mit einem Mischfutter (sniff Alleinfutter für Ratten, Kraftfutterwerke Plange, Soest/Westfalen) gefüttert, Wasser stand ad libitum zur Verfügung.

2. Durchführung der Diureseversuche

Die Versuche begannen stets morgens zwischen 7.30 und 8.00 Uhr mit dem Wiegen der Tiere und anschließendem Sondieren der entsprechenden Flüssigkeitsmenge mit Hilfe einer Schlundsonde aus V₂A-Stahl. Während des Sondierens entleerten die Ratten in der Regel spontan Harn, so daß ein vorsichtiges Abstreichen der Blase meist erfolglos blieb. Unmittelbar nach dem Sondieren wurden die Tiere in Diuresekäfige gesetzt, in denen sie in der Regel 24, bei einem Teil der Versuche 7 Stunden nüchtern und unter Wasserentzug saßen.

In den Versuchspausen wurden zwei bis fünf Tiere - je nach Größe und Gewicht - in Makrolon-Käfigen, wo sie ad libitum fressen und saufen konnten, gehalten.

Zu vergleichenden Untersuchungen setzten wir die Tiere vor Versuchsbeginn 12 bis 14 Stunden nüchtern und unter Wasserentzug (siehe Versuchsanordnung von H. Vollmer und K. Hübner, 1937; H. Vollmer und A. Giebel, 1938).

In allen Versuchen wurden Kontroll- und Drogenversuche nebeneinander angesetzt. Die von uns zu vergleichenden Untersuchungen durchgeführten Doppelversuche (siehe Kreuztest nach J. H. Burn, 1937) erstreckten sich über 3 Tage und waren so angeordnet, daß die Kontrolltiergruppe des ersten Versuchstages als Drogentiergruppe des dritten Versuchstages und die Drogentiergruppe des ersten Versuchstages als Kontrolltiergruppe des dritten Versuchstages eingesetzt wurde. Nach dem Sondieren am Morgen des ersten und dritten Versuchstages saßen die Tiere nüchtern und unter Wasserentzug jeweils 7 Stunden in Diuresekäfigen. Vom Abend des ersten Versuchstages bis zum Morgen des dritten Versuchstages hielten wir die Tiere in Makrolon-Käfigen, wo sie ad libitum fressen und saufen konnten.

Schematische Darstellung dieser Versuchsanordnung:

	1. Tiergruppe	2. Tiergruppe
1. Versuchstag	Kontrolltiere	Drogentiere
2. Versuchstag	Ruhetag	Ruhetag
3. Versuchstag	Drogentiere	Kontrolltiere

Als Diuresekäfig benutzten wir einen runden Plastikbehälter (Trovidur[®]), dessen Boden aus einem Drahtnetz bestand und der durch einen mit Luftlöchern versehenen Schraubdeckel verschlossen werden konnte. Dieser Behälter stand in einem großen Teflontrichter mit Auslauf in einen 100 ml-Plastikmeßzylinder. Die Maschenweite des Drahtnetzes, auf dem die Tiere während des Versuches saßen, war so gewählt, daß Kotballen nicht hindurchfielen, der Harn aber ungehindert in den darunterstehenden Meßzylinder ablaufen konnte. Je nach Größe saßen ein, zwei oder drei Tiere zusammen in einem Diuresekäfig.

Die Messung der ausgeschiedenen Harnmenge erfolgte durch Ablesen im Meßzylinder und darauffolgender Entnahme des Harns mit einer graduierten Spritze, wodurch auch kleine Mengen quantitativ erfaßt werden konnten. In Vorversuchen wurden die Messungen alle 15 Minuten während der ersten Stunde, alle 60 Minuten in den folgenden 6 Stunden und 24 Stunden nach Einsetzen der Tiere in die Diuresekäfige durchgeführt. In den Hauptversuchen beschränkten wir uns auf stündliches Ablesen der ausgeschiedenen Harnmenge innerhalb der ersten 7 Stunden des Versuches. Zudem führten wir - im überwiegenden Teil der Hauptversuche - 24 Stunden nach Versuchsbeginn eine abschließende Harnmessung durch.

3. Auf diuretische Wirksamkeit untersuchte Stoffgruppen

a) Ätherische Öle aus Wurzel und Kraut der Droge

Als Ausgangsmaterial für unsere Versuche diente die bereits beschriebene Droge (siehe S. 1), von der wir sowohl die unterirdischen als auch die oberirdischen Teile verwendeten.

Alle ätherischen Öle wurden durch Wasserdampfdestillation (siehe S.110) gewonnen, wobei auf einen Teil der Droge zehn Teile Wasser gegeben wurden. Die Destillationsdauer der Wurzeldroge war unterschiedlich und reichte von einer halben bis sechs Stunden. Für jede Destillationszeit wurde neue Droge frisch angesetzt. Die Destillationsdauer der Krautdroge betrug ausschließlich sechs Stunden.

Die Gaben an ätherischem Wurzelöl differierten von 0,0625 mg bis 10,0 mg pro Tier und Versuch (Hauptversuche); in einem Teil der Versuche (vergleichende Untersuchungen) betrugen sie 0,5 mg pro 100 g Körpergewicht der Tiere.

Von dem ätherischen Krautöl sondierten wir ausschließlich Gaben von 0,5 und 1,0 mg pro Tier.

Es wurde geprüft: Radix Ononidis, ätherisches Öl, gewonnen durch

sechsstündige Destillationsdauer:	0,0625 mg / Tier	
	0,125 mg	"
	0,25 mg	"
	0,5 mg	"
	1,0 mg	"
	2,0 mg	"
	2,5 mg	"
	4,0 mg	"
	5,0 mg	"
	10,0 mg	"
vierstündige Destillationsdauer:	0,5 mg / Tier	
	1,0 mg	"
	0,5 mg / 100 g Tier	
zweistündige Destillationsdauer:	0,5 mg / Tier	
	1,0 mg	"
einstündige Destillationsdauer:	0,5 mg / Tier	
	1,0 mg	"
halbstündige Destillationsdauer:	0,5 mg / Tier	
	1,0 mg	"

Herba Ononidis, ätherisches Öl, gewonnen durch

sechsstündige Destillationsdauer:	0,5 mg / Tier
	1,0 mg " .

Alle ätherischen Öle wurden auf einem Wasserbad von 40-50°C vorsichtig erwärmt und nacheinander die auf gleiche Temperatur gebrachten Milch- (10 % der Gesamtflüssigkeitsmenge) und Wasseranteile (90 % der Gesamtflüssigkeitsmenge) portionsweise und unter Schütteln zugesetzt. Die verwendeten Milchanteile hatten einen Fettgehalt von 3,75 % und wurden durch Verdünnen von Kondensmilch (7,5 % Fettgehalt) mit Wasser 1 : 1 gewonnen.

Als Kontrolle wurde eine Milch-Wasser-Emulsion (10 % Milch, mit einem Fettgehalt von 3,75 %, und 90 % Wasser) verwendet.

b) Fractionen der ätherischen Öle aus Wurzel und Kraut der Droge

Zur Fraktionierung verwendeten wir das durch vierstündige Destillation gewonnene ätherische Wurzelöl und das durch sechsstündige Destillation gewonnene ätherische Krautöl. In orientierenden Versuchen wurden die auf chemischem Wege (siehe S. 114) vom ätherischen Wurzelöl abgetrennten Fraktionen der Fettsäuren, Kohlenwasserstoffe, Carbonylverbindungen und Alkohole sowie das verbleibende ätherische Restöl an der Ratte auf diuretische Wirksamkeit geprüft.

Für weitere Untersuchungen (Hauptversuche) wurden sowohl ätherisches Wurzel- als auch ätherisches Krautöl in Fettsäuren, Kohlenwasserstoffe und Restöl getrennt. Alle Fraktionen sowie das verbleibende ätherische Restöl wurden wiederum - wie bereits beschrieben (siehe oben) - in einer Milch-Wasser-Emulsion (10 % Milch, 90 % Wasser) auf ihre Wirksamkeit geprüft. Die Einzelgabe entsprach dem durch quantitative Bestimmung ermittelten Anteil (siehe S. 20) der einzelnen Fraktionen am ätherischen Gesamtöl und wurde beim ätherischen Krautöl ausschließlich auf Gaben von 0,5 mg pro Tier berechnet. Beim ätherischen Wurzelöl wurde sowohl auf Gaben von 1,0 mg pro Tier als auch auf Gaben von 0,5 mg pro 100 g Tier bezogen und von diesen so errechneten Dosen in einigen Versuchen die Hälfte bzw. das Doppelte verabreicht.

Es wurde in den Hauptversuchen geprüft :

Radix Ononidis,

Fraktion der Fettsäuren:	0,5 mg / Tier
	0,25 mg / 100 g Tier
	0,125 mg / " "
	0,5 mg / " "

Fraktion der Kohlenwasserstoffe:	0,25 mg / Tier
	0,125 mg / 100 g Tier
	0,063 mg / " "
	0,25 mg / " "

Ätherisches Restöl:	0,25 mg / Tier
	0,125 mg / 100 g Tier
	0,063 mg / " "
	0,25 mg / " "

Herba Ononidis,

Fraktion der Fettsäuren:	0,38 mg / Tier
--------------------------	----------------

Fraktion der Kohlenwasserstoffe:	0,03 mg / Tier
----------------------------------	----------------

Ätherisches Restöl:	0,1 mg / Tier
---------------------	---------------

Als Kontrolle wurde eine Milch-Wasser-Emulsion (10 % Milch, mit einem Fettgehalt von 3,75 %, und 90 % Wasser) verwendet.

c) Infuse und Dekokte aus Wurzel und Kraut der Droge

Infuse und Dekokte aus Wurzel und Kraut der Droge wurden in der Regel nach Vorschrift des DAB 6, in einigen Fällen nach Vorschrift des DAB 7 zubereitet. Dabei beschränkten wir uns bei der Zubereitung von Infusen und Dekokten aus Wurzeldroge nicht auf das im DAB 6 angegebene Verhältnis von einem Teil Droge auf zehn Teile Wasser, sondern stellten von diesem Ansatz verschiedene Verdünnungen her, indem wir einen Teil Infus bzw. Dekokt auf 2,5 , 5 und 10 Teile Wasser gaben. Außerdem wurden Infuse und Dekokte aus Wurzeldroge analog der Vorschrift des DAB 6, jedoch in stärkerer Konzentration zubereitet, wobei ein Teil der Droge mit fünf Teilen Wasser angesetzt wurde.

Es wurde geprüft:

Radix Ononidis, Infus,

1 Teil Droge : 5 Teile Wasser (analog der Vorschrift des DAB 6);

Radix Ononidis, Infus,

1 Teil Droge : 10 Teile Wasser, nach Vorschrift des DAB 6 ;

Verdünnungen des nach DAB 6 hergestellten Infuses,

1 Teil Infus : 2,5 Teile Wasser,

1 Teil Infus : 5 Teile Wasser,

1 Teil Infus : 10 Teile Wasser;

Radix Ononidis, Infus,

1 Teil Droge : 10 Teile Wasser, nach Vorschrift des DAB 7 ;

Radix Ononidis, Dekokt,

1 Teil Droge : 5 Teile Wasser (analog der Vorschrift des DAB 6);

Radix Ononidis, Dekokt,

1 Teil Droge : 10 Teile Wasser, nach Vorschrift des DAB 6 ;

Verdünnungen des nach DAB 6 hergestellten Dekoktes,

1 Teil Droge : 2,5 Teile Wasser,

1 Teil Droge : 5 Teile Wasser

1 Teil Droge : 10 Teile Wasser;

Radix Ononidis, Dekokt,

1 Teil Droge : 10 Teile Wasser, nach Vorschrift des DAB 7 ;

Herba Ononidis, Infus,

1 Teil Droge : 10 Teile Wasser, nach Vorschrift des DAB 6 ;

Herba Ononidis, Dekokt,

1 Teil Droge : 10 Teile Wasser, nach Vorschrift des DAB 6 .

Die jeweilige Gabe betrug im Hauptteil der Versuche 5 ml Flüssigkeit pro Tier.

Zu vergleichenden Untersuchungen wurden Gaben von 2,5 ml Flüssigkeit pro 100 g Tier verabreicht.

Als Kontrolle wurde Wasser verwendet.

d) Wäßrige Rückstände der Wasserdampfdestillation der Wurzeldroge

Die wäßrigen Rückstände der Wasserdampfdestillationen (siehe S. 110) der untersuchten Wurzeldroge wurden gewonnen, indem wir den nach halb-, ein-, zwei-, vier- und sechsständiger Destillation verbleibenden flüssigen Rückstand vom festen Rückstand abfiltrierten und ohne weitere Verdünnung den Tieren mittels Schlundsonde verabreichten.

Es wurde geprüft:

Radix Ononidis, wäßriger Rückstand der 6-stündigen Destillation

4-	"	"
2-	"	"
1-	"	"
1/2-	"	"

Die jeweilige Einzelgabe betrug 5 ml Flüssigkeit pro Tier.

Als Kontrolle wurde Wasser verwendet.

4. Bestimmung der Na^+ -, K^+ - und Cl^- -Ionenkonzentrationen

Die Bestimmung der Na^+ - und K^+ -Ionenkonzentrationen wurde mit Harnen, die nach Sondieren von ätherischen Wurzel- und Krautölen ausgeschieden worden waren, durchgeführt. Sondierte wurden die durch halb-, ein-, zwei-, vier- und sechsständige Wasserdampfdestillation gewonnenen ätherischen Wurzelöle und das nach sechsständiger Destillation abgeschiedene ätherische Krautöl der Droge.

Zur Bestimmung der Cl^- -Ionenkonzentration verwendeten wir ausschließlich Harnen, die nach Verabreichen des durch vierständige Destillation der Wurzeldroge erhaltenen ätherischen Öles gesammelt worden waren.

Die jeweilige Einzelgabe des ätherischen Wurzelöles wurde sowohl pro Tier als auch pro 100 g Tier, die des ätherischen Krautöles ausschließlich pro Tier bemessen. Alle weiteren Versuchsbedingungen entsprachen den der bereits beschriebenen Hauptversuche mit ätherischen Ölen aus Wurzel und Kraut der Droge (siehe S.127). Untersucht wurden Harnen, die während der ersten zwei bzw. drei Stunden des Versuches und von der zweiten bzw. dritten bis siebten Stunde einschließlich gesammelt worden waren.

Die Na^+ - und K^+ -Ionenkonzentrationen wurden mit Hilfe des Eppendorf-Flammen-photometer (Firma Netheler und Hinz, Hamburg); die Cl^- -Ionenkonzentration potentiometrisch mit 0,02 N AgNO_3 -Lösung (Metrohm Potentiograph E 336 A, Multi-Titrierstand GB4-436 E) bestimmt.

5. Statistische Auswertung und graphische Darstellung der Versuche

Die statistische Auswertung (L.Sachs, 1969) der Versuche wurde durchgeführt durch Errechnen des Mittelwertes nach der Formel

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} ,$$

der Standardabweichung

$$S_e = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

und des Fehlers des Mittelwertes

$$S_m = \frac{S_e}{\sqrt{n}} ,$$

wobei n die jeweilige Anzahl der Werte ist.

Die Mittelwerte der Drogenversuche wurden mit den dazugehörigen Mittelwerten der Kontrollversuche (Kontrolle = 100) in Beziehung gesetzt.

Die statistische Auswertung der Versuche erfolgte ferner durch Errechnen der Signifikanz mit Hilfe des t-Testes nach Student und des Mann-Whitney-Testes, je nachdem, ob in der zu vergleichenden Kontroll- und Versuchsgruppe eine Normalverteilung vorlag oder nicht. Die Überprüfung auf Normalverteilung wurde bei nicht mehr als zwanzig Werten mit dem Nullklassentest, sonst mit dem Chiquadrat-test vorgenommen.

Beim t-Test wird die Prüfgröße t nach der Formel

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

berechnet, wobei $\bar{x}_1$ und $\bar{x}_2$ die beiden gegebenen Mittelwerte, s_1 und s_2 die beiden zugehörigen Standardabweichungen und n_1 und n_2 die Anzahl der Werte bedeuten. Zu dieser Prüfgröße t läßt sich in eindeutiger Weise die Irrtumswahrscheinlichkeit α dafür angeben, daß die beiden betrachteten Mittelwerte signifikant voneinander verschieden sind ($p = \text{probability} = \alpha / 100$).

Es lassen sich folgende Abstufungen der Signifikanz unterscheiden:

$\alpha \leq 5\%$: signifikant ($p \leq 0,05$)

$\alpha \leq 1\%$: sehr signifikant ($p \leq 0,01$)

$\alpha \leq 0,1\%$: höchst signifikant ($p \leq 0,001$)

Beim Mann-Whitney-Test wird eine gemeinsame Rangreihe der Werte aus beiden Gruppen gebildet. Anschließend berechnet man die Summe der Rangzahlen in beiden Gruppen. Zu diesen Rangsummen läßt sich wieder (siehe t-Test) in eindeutiger Weise die Irrtumswahrscheinlichkeit α dafür bestimmen, daß die Mittelwerte der beiden betrachteten Gruppen signifikant voneinander verschieden sind.

Die graphische Darstellung erfolgte für alle Hauptversuchsgruppen und alle gemessenen Zeiten. Hierbei wurden der Mittelwert und der Fehler des Mittelwertes des jeweiligen Gesamtharns in ml pro Tier und Stunde im Koordinatensystem aufgetragen.

C. Literaturverzeichnis

- Ackmann, R.G.: Fundamental groups in the response of flame ionization detectors to oxygenated aliphatic hydrocarbons.
J. Gas Chromatogr. 2, 173-179 (1964).
- Asakawa, Y.: A New Ketol, 1,7-Diphenyl-5-hydroxy-3-heptanone, and trans-Stilbene from *Alnus firma* Sieb. et Zucc. (Betulaceae).
Bull. chem. Soc. Japan 43 (2), 575 (1970).
- Bauer, K.H. und H. Moll: Die organische Analyse, 3. Auflage, S. 260.
Gêest u. Portig Verlag, Leipzig 1954.
- Bayer, E.: Gaschromatographie, S. 137-142. Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1962.
- Beitz, H., F. Seefeld und F. Pank: Pflanzenschutzmittel-Rückstände an Arzneipflanzen- DDT- und Lindan-Rückstände in Pfefferminze. Pharmazie 28 (4), 270-271 (1973).
- Berger, F.: Handbuch der Drogenkunde, Bd. V, S. 317. Wilhelm Maudrich Verlag, Wien, Bonn, Berlin 1960.
- Bhacca, N.S., L.F. Johnson und J.N. Shoolery: NMR Spectra Catalog, Varian Associates, 1962.
- Budzikiewicz, H., C. Djerassi und D.H. Williams: Mass Spectrometry of Organic Compounds. Holden-Day, Inc., San Francisco, Cambridge, Amsterdam 1967.
- Bulkowstein, I.: In R. Kobert: Neuere Beiträge zur Kenntnis der Saponinsubstanzen, I, S. 34. F. Enke Verlag, Stuttgart 1916.
- Buelow, W.: Beiträge zur Kenntnis der Radix Ononidis. Dissertation, Dorpat 1891.
- Burn, J.H.: Biologische Auswertungsmethoden. Springer Verlag, Berlin 1937.
- Brunnée, C., H.J. Bültemann und G. Kappus: Abstracts of Papers, Presented at the Seventeenth Annual Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Dallas, Texas, 1969, S. 121.

- Casu, B. und M. Reggiani: Riv. ital. Essenze 38, 453 (1956), zitiert nach
E. Gildemeister und F. Hoffmann: Die ätherischen Öle, hrsg. von
Treibs, S. und Bournot, K., Bd. V, S. 520. Akademie Verlag,
Berlin 1959.
- Catalog of Mass Spectral Data. American Petroleum Institute, Research Project 44,
Carnegie Institute of Technology, Pittsburgh, Pa., zitiert in Budzikiewicz, H.,
C. Djerassi und D. H. Williams: Mass Spectrometry of Organic Compounds,
S. 86. Holden-Day, Inc., San Francisco, Cambridge, Amsterdam 1967.
- Chemiker Kalender, herausgegeben von Dr. H. U. v. Vogel, Springer Verlag,
Berlin, Göttingen, Heidelberg 1956.
- Cow, D.: Einige Studien über Diurese. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol.
Pharmakol. 69, 393-411 (1912).
- Deutsches Arzneibuch, 6. Ausgabe, R. v. Decker's Verlag, Berlin 1926.
- Deutsches Arzneibuch, 7. Ausgabe, Deutscher Apotheker-Verlag, Stuttgart,
Govi-Verlag GmbH, Frankfurt 1968.
- Deutsches Arzneibuch, 7. Ausgabe DDR, Akademie Verlag, Berlin 1964.
- Dimmel, D. R. und J. Wolinsky: Preferential Methyl Eliminations in Camphor and
Isoborneol on Electron Impact. J. org. Chemistry 32, 410-416
(1967).
- - - An Electron-Impact Study of Norbornane Derivatives.
J. org. Chemistry 32, 2735-2739 (1967).
- Ehrhart, G. und H. Ruschig: Arzneimittel, Entwicklung, Wirkung, Darstellung,
Bd. 2, S. 324-328. Verlag Chemie, Weinheim/Berg-
straße 1972.
- Farnow, H.: Gas-Chromatographie, hrsg. von Firma Dragoco, Holzminden, ohne
Jahr.
- Fischer, R. und F. Still: Untersuchungen über genuine ätherische Öle (I. Mitteilung).
Planta med. [Stuttgart] 15, 6-16 (1967).

- Friedrich, H. und H.G.Büter: Problematik der Anwendung von Pestiziden im Arzneipflanzenbau - Untersuchungen an *Mentha piperita* L., Grundsätzliche Betrachtungen und Ausgangssituation. Dtsch. Apotheker-Ztg. 114, 1793-1799, 1875-1877, 1980-1984 (1974) und 115, 179-185 (1975).
- Fujise, Y., T.Toda und S.Ito: Isolation of trifolirhizin from *Ononis spinosa*. Chem. pharmac. Bull. [Tokyo] 13, 93-95 (1965).
- Gildemeister, E. und F.Hoffmann: Die ätherischen Öle, hrsg. von Treibs, S. und Bournot, K., Bd. I-VII. Akademie Verlag, Berlin 1959-1966.
- Glaser, A., G.Grimmer, E.Jantzen und H.Oertel: Eine Methode zur Bestimmung der Fettsäuren des Human-Blutes unter besonderer Berücksichtigung der in geringen Mengen vorkommenden Fettsäuren. Biochem. Z. 336, 274-280 (1962).
- Glichitsch, L.-S. und Y.-R.Naves: Sur l'évaluation de la teneur en alcools primaires des huiles essentielles par phtalisation analytique. Parfums de France 11, 235-238 (1933).
- Groebl, W.: Mündl.Mitt. am 29.3.1972, siehe H.Friedrich und H.G.Büter: Dtsch. Apotheker-Ztg. 114, 1798 (1974).
- Güntzel, U., F.Seidel und H.Kating: Untersuchungen über die Inhaltsstoffe von Arnica-Arten. I. Der Gehalt an ätherischem Öl in den Blüten verschiedener Arnica-Arten. Planta med. [Stuttgart] 15, 205-213 (1967).
- Hathway, D.E. und J.W.T.Seakins: Hydroxystilbenes of *Eucalyptus wandoo*. Biochem. J. 72, 369-374 (1959).
- Haensel, H.: Aus dem Berichte von Heinrich Haensel, Fabriken ätherischer Öle und Essenzen, Pirna,Sachsen (Stammhaus), Aussig, Böhmen (Zweigfabrik) über Oktober-März 1909/10. Apotheker-Ztg. 25, 303 (1910).
- Hänsel, R.: Phytotherapie und Naturwissenschaft. Pharmaz. Ztg. 120, 589-596 (1975).

- Hegi, G.: Illustrierte Flora von Mitteleuropa, Bd. IV/3, S. 1223.
Carl Hanser-Verlag München 1924.
- Hehenkamp, Th.: Über die harntreibende Wirkung von Spec.diuret., Radix Ononidis
u. Tartarus borax. Dissertation, Marburg/L. 1923.
- Herre, E.: Die diuretische Wirkung der in der Naturheilkunde u. Volksmedizin angewandten harntreibenden Mittel. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. 184, 710-715 (1937).
- Heusser, D.: Dünnschichtchromatographie von Fettsäuren auf silanisiertem Kieselgel. J. Chromatogr. [Amsterdam] 33, 62-69 (1968).
- Hillis, W.E.: Variation in polyphenol composition within species of Eucalyptus. Phytochemistry 5 (4), 541-556 (1966).
- Houben-Weyl: Methoden der organischen Chemie, hrsg. von E. Müller, Bd. I/2, allgemeine Laboratoriumspraxis II, S. 424, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1959.
- Janku, I., M.Hava und O.Motl: Ein diuretisch wirksamer Stoff aus Wacholder (Juniperus communis L.). Experientia [Basel] 13, 255-256 (1957).
- Jantzen, E. und H.Andreas: Reaktion ungesättigter Fettsäuren mit Quecksilber (II)-acetat; Anwendung für präparative Trennungen, I. Chem. Ber. 92, 1427-1437 (1959).
- Jaretzky, R. und A.Sievers: Pharmakologische Untersuchungen über Ononis spinosa. Die deutsche Apotheke 2, 5 (1933).
- Jaretzky, R. und F.Neuwald: Diuretische und antidiuretische Wirkung der Radix Ononidis bei Ratten. Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 276, 114-121 (1938).
- Jaretzky, R. und F.Neuwald: Über die diuretische Wirkung des ätherischen Öles der Radix Ononidis bei Ratten. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. 192, 586-589 (1939).

- Juvonen, S.: Pharmazeutische Untersuchungen von Rosenölen. *Planta med.*
[Stuttgart] 12, 488-500 (1964).
- Kachler, J.: Ueber den Perubalsam. *Ber. dtsh. chem. Ges.* 2, 512 (1869).
- Kaiser, R.: Chromatographie in der Gasphase. 4. Teil: Quantitative Auswertung,
S. 201, Bibliographisches Institut, Mannheim 1965.
- Karrer, P.: Lehrbuch der Org. Chemie, S. 975-987. Georg Thieme Verlag,
Stuttgart 1959.
- Karrer, W.: Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe, S. 27.
Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart 1958.
- Karsten, G., U. Weber und E. Stahl: Lehrbuch der Pharmakognosie, 9. Auflage.
G. Fischer Verlag, Stuttgart 1962.
- Kating, H., W. Rinn und G. Willuhn: Untersuchungen über die Inhaltsstoffe von
Arnica-Arten. III. Die Fettsäuren in den ätherischen Ölen der Blüten
verschiedener Arnica-Arten. *Planta med.* [Stuttgart] 18, 130-146 (1970).
- Kating, H., W. Rinn und F. Seidel: Das ätherische Öl von Arnica Chamissonis Less.
Abhandlungen der Marburger Gelehrten Gesellschaft, Jahrgang 1971 Nr. 4,
S. 174-175. Wilhelm Fink Verlag, München 1973.
- Kirchner, J. G. und J. M. Miller: Preparation of terpeneless essential oils.
A chromatographic process. *Ind. Engng. Chem.* 44, 318-321 (1952).
- Laitinen, H. A., F. A. Miller und T. D. Parks: Ultraviolet Absorption Spectra of Sub-
stituted Vinyl Aromatic Monomers and Polymers. *J. Amer. chem. Soc.*
69, 2707-2714 (1947).
- Lebensmittelrecht, Bundesgesetze und -verordnungen über Lebensmittel und Bedarfs-
gegenstände. Textsammlung mit Verweisungen und Sachverzeichnis, Stand:
1. Februar 1975. C. H. Beck'sche Verlagsbuchhandlung München.
- Lindstedt, G. und A. Misiorny: Constituents of Pine Heartwood, Investigation of
Forty-Eight Pinus Species by Paper Partition Chromatography.
Acta chem. scand. 5, 121-128 (1951).

- Lotz, K.: Über die diuretische Wirkung von *Equisetum arv.*, *Rad. Levistici* und *Rad. Ononidis*. Dissertation, Marburg/L. 1923.
- Madaus, G.: Lehrbuch der Biologischen Heilmittel, Abteilg. I: Heilpflanzen, Bd. III, S. 2021. G.Thieme Verlag, Leipzig 1938.
- Mangold, H.K. und R.Kammereck: Separation, identification and quantitative analysis of fatty acids by thin-layer chromatography and gas-liquid chromatography. *Chem. and Ind.*, 1032-1034 (1961).
- Moll, F. und J.HeiB: Die Massenspektren des γ -Hexachlorcyclohexans und seiner α -, β - und δ -Isomere. *Dtsch. Apotheker-Ztg.* 109, 1525-1528 (1969).
- Neuwald, F.: Über einen neuen Inhaltsstoff der Wurzel von *Ononis spinosa* L. *Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges.* 277, 130-132 (1939).
- Nufer, H.F.E.: Zur Analytik des Lindenblütenöls und der Senföle. Dissertation, München 1965.
- Österreichisches Arzneibuch 9.Ausgabe, Österreichische Staatsdruckerei, Wien 1960.
- Rehm, K.D.: Untersuchungen zur Analytik und über das Vorkommen von Hydroxy-fettsäuren im Pflanzenreich. Dissertation, München 1967.
- Rinn, W.: Untersuchung der ätherischen Blüten- und Rhizomöle von *Arnica chamissonis* Less. Dissertation, Marburg/L. 1970.
- Ryhage, R. und E.Stenhagen in F.W. Mc Lafferty: *Mass Spectrometry of Organic Ions*, S. 399. Academic Press, New York 1963.
- Sachs, L.: *Statistische Auswertungsmethoden*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1969.
- Schiratz, E. und S.Qedan: Die Zusammensetzung des ätherischen Öles in der Sammelart *Thymus serpyllum*. 1.Mitteilung: Der dünn-schichtchromatographische Nachweis der Ölkompnenenten. *Pharmazie* 20, 710-713 (1965).
- Schlenk, W.: Über aliphatische Harnstoffaddukte, eine neue Kategorie von Additionsverbindungen. *Angew. Chem.* 61, 447 (1949).

- Spiteller, G.: Massenspektrometrische Strukturanalyse organischer Verbindungen. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1966.
- Sprecher, E.: Rücklaufapparatur zur erschöpfenden Wasserdampfdestillation ätherischen Öls aus voluminösem Destillationsgut. Dtsch. Apotheker-Ztg. 103, 213-214 (1963).
- Stahl, E.: Eine neue Apparatur zur gravimetrischen Erfassung kleinster Mengen ätherischer Öle. Mikrochem. verein. Mikrophim. Acta [Wien] 40, 367-372 (1953).
- Stahl, E.: Dünnschichtchromatographie. Ein Laboratoriumshandbuch, 2. Auflage. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1967.
- v. Sydow, E.: Mass Spectrometry of Terpenes. II. Monoterpene Alcohols. Acta chem. scand. 17, 2504-2512 (1963).
- - - Mass Spectrometry of Terpenes. III. Monoterpene Aldehydes and Ketones. Acta chem. scand. 18, 1099-1104 (1964).
- Thomas, A. F. und B. Willhalm: Mass Spectra and Organic Analysis. Part VII. The Mass Spectra of the Menthols, Carvomenthols, their Acetates and related Alcohols. J. chem. Soc. [London] B, 219-227 (1966).
- Toth, L.: Untersuchungen über das ätherische Öl von Foeniculum vulgare. II. Veränderungen der verschiedenen Fenchelöle vor und nach der Ernte. Planta med. [Stuttgart] 15, 371-389 (1967).
- Tschirch, A.: Handbuch der Pharmakognosie, III. Bd., 2. Abt., S. 768. Verlag Chr. Herm. Tauchnitz, Leipzig 1925.
- Viogue, E. und R. T. Holman: Quantitative estimation of esters by thin-layer chromatography. J. Amer. Oil Chemists' Soc. 39, 63-66 (1962).
- Viscontini, M. und J. Meier: N-Dimethylglycin-hydrazid-hydrochlorid, Reagenz zur Isolierung und Charakterisierung von Carbonyl-Derivaten. Helv. chim. Acta 33, 1773-1775 (1950).
- Vollmer, H. und H. Hindemith: Untersuchungen über die diuretische Wirkung von Ononis spinosa L. und Equisetum arvense L. an Kaninchen und Mäusen. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 186, 565-573 (1937).

- Vollmer, H. und K. Hübner: Untersuchungen über die diuretische Wirkung der Fructus Juniperi, Radix Levistici, Radix Ononidis, Folia Betulae, Radix Liquiritiae und Herba Equiseti an Ratten. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 186, 592-605 (1937).
- Vollmer, H. und A. Giebel: Untersuchungen über die diuretische Wirkung mehrerer Kombinationen von Fructus Juniperi und Radix Ononidis. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 190, 522-534 (1938).
- Vollmer, H.: Über die diuretische Wirkung der Radix Ononidis und der Herba Equiseti. Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 278, 42-44 (1940).
- - - Über die diuretische Wirkung der Radix Ononidis. Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 278, 283-284 (1940).
- Wagner, H. und P. Pohl: Zur Analytik von Polyenfettsäuren. I. Biochem. Z. 340, 337-344 (1964).
- Weinberg, D. S. und C. Djerassi: Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems. LXXXVIII. Rearrangements of Simple Terpenes on Electron Impact. J. org. Chemistry 31, 115-119 (1966).
- Wenger, E.: Analytik und Zusammensetzung des dalmatinischen und spanischen Salbeiöles. Dissertation, Tübingen 1960.
- Willhalm, B. und A. F. Thomas: Mass Spectra and Organic Analysis. Part VI. The Mass Spectra of Menthone, Isomenthone and Carvomenthone. J. chem. Soc. [London], 6478-6485 (1965).
- Williams, D. H. und I. Fleming: Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, S. 160 und 165. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1968.
- Wolf, F.: Harnstoffeinschlußverbindungen aus Zibet sowie ätherischen und konkreten Ölen: Eine neue analytische und präparative Methode. Riechstoffe u. Aromen 10, 33-37 (1960).

Lebenslauf

Am 10.7.1940 wurde ich als Tochter des Dr. rer. pol. Erich Feuersänger und seiner Ehefrau Helene, geborene Hebel, in Bad Kreuznach geboren.

Von Herbst 1946 bis Ostern 1951 besuchte ich die Volksschule und anschließend die Frauenoberschule in Bad Kreuznach.

Im Oktober 1952 übersiedelten meine Eltern und ich nach Essen, wo ich am Mädchengymnasium Essen-Bredeney 1961 die Reifeprüfung ablegte.

Von 1961 bis 1962 studierte ich an der Universität Heidelberg und von 1962 bis 1964 an der Philipps-Universität Marburg/L. Jura und Volkswirtschaft.

Am 1.4.1964 begann ich in der Apotheke am Südbahnhof in Marburg/L. meine Praktikantenausbildung, die ich am 1.9.1966 in Kassel mit dem Pharmazeutischen Vorexamen abschloß.

Ab Wintersemester 1966 studierte ich Pharmazie an der Philipps-Universität Marburg/L. Hier bestand ich am 10.10.1969 das Pharmazeutische Staatsexamen.

Als Kandidatin der Pharmazie arbeitete ich von November 1969 bis November 1970 in der Neuen Trauben Apotheke in Marburg/L. und erhielt am 15.11.1970 die Approbation als Apothekerin.

Im Dezember 1970 begann ich die vorliegende Arbeit unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Kating am Institut für Pharmazeutische Biologie, wo ich von Dezember 1970 bis März 1975 als wissenschaftliche Angestellte beschäftigt war.

Seit 1963 bin ich mit dem Apotheker und Diplom-Chemiker Dr. Manfred Hilp verheiratet.

